



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 6 : C12N 15/88, 15/10, A61K 9/51, C12N 15/11, 9/00, A61K 47/48		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/29557 (43) Date de publication internationale: 9 juillet 1998 (09.07.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/02332		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet curasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Date de dépôt international: 17 décembre 1997 (17.12.97)			
(30) Données relatives à la priorité: 96/16121 27 décembre 1996 (27.12.96) FR			
(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): BIOVECTOR THERAPEUTICS (S.A.) [FR/FR]; Chemin du Chêne Vert, Boîte postale 169, F-31676 Labège Cedex (FR).			
(72) Inventeurs; et		Publiée	
(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): BETBEDER, Didier [FR/FR]; 16, place de la Peupleraie, F-31140 Aucamville (FR). KRAVTZOFF, Roger [FR/FR]; Lieu Dit "Damiac", F-31450 Fourquevaux (FR). DE MIGUEL, Ignacio [FR/FR]; 5, rue Pasteur, F-31830 Plaisance du Touch (FR). SIXOU, Sophie [FR/FR]; 2, rue des Novars, F-31300 Toulouse (FR). PAVCO, Pamela [US/US]; 705 Barberry Circle, Lafayette, CO 80026 (US). JARVIS, Thale [US/US]; 3720 Smuggler Place, Boulder, CO 80303 (US).		<i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
(74) Mandataire: BREESE-MAJEROWICZ; 3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).			
<p>(54) Title: CONJUGATES OF A PARTICLE VECTOR AND OLIGONUCLEOTIDES, PROCESS FOR THEIR PREPARATION, AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING THEM</p> <p>(54) Titre: CONJUGUES D'UN VECTEUR PARTICULAIRE ET D'OLIGONUCLEOTIDES, LEUR PROCEDE DE PREPARATION ET LES COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES CONTENANT</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to an ionic conjugate, which is stable in a biological medium, and which is comprised of a particle vector with at least one cationic, nonliquid, hydrophilic nucleus and of polyanionic oligonucleotides. The invention further concerns the pharmaceutical compositions containing these conjugates and the use of a particle vector to carry the oligonucleotides to the cells.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention concerne un conjugué ionique, stable dans un milieu biologique, d'un vecteur particulaire comprenant au moins un noyau hydrophile non liquide cationique et d'oligonucléotides polyanioniques. L'invention concerne aussi les compositions pharmaceutiques contenant ces conjugués et l'utilisation de vecteur particulaire pour délivrer des oligonucléotides dans les cellules.</p> <p>102(5) = 1-3, 5-8, 10-13, 18 ? = 4, 14-17, 19 103 = 4 4 = NG ENAB, CAN'T MAKE 15, 16, 19 \Rightarrow charge ratio \Rightarrow REV - 14 = size 17 = excess polyhydroxyl nucleic not compleated</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lithuanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GR	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizstan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

CONJUGUÉS D'UN VECTEUR PARTICULAIRE ET
D'OLIGONUCLÉOTIDES, LEUR PROCÉDÉ DE PRÉPARATION ET LES
COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES CONTENANT.

5 L'invention se rapporte à des conjugués permettant l'adressage d'oligonucléotides, antisens et de ribozymes, dans les cellules, leur procédé de préparation et les compositions pharmaceutiques les contenant.

10 Les oligonucléotides constituent une classe de molécules particulièrement intéressante du fait de leur aptitude à former par hybridation des complexes spécifiques avec des séquences d'acides nucléiques complémentaires. Ces complexes peuvent se présenter sous 15 la forme de duplexes résultant de l'hybridation d'oligonucléotides avec des séquences d'ADN simples brins ou avec des séquences d'ARN, comme de l'ARNm, ou encore sous forme de triplexes, par hybridation avec des molécules d'ADN doubles brins (1-6).

20 Les propriétés rappelées ci-dessous confèrent aux oligonucléotides des possibilités d'applications remarquables pour l'étude des gènes et dans le domaine thérapeutique (17). Ainsi, l'invention se rapporte plus particulièrement aux oligonucléotides 25 antisens et aux ribozymes, dont on a déjà étudié la capacité à inhiber spécifiquement l'expression de gènes sur des modèles *in vitro* (16, 18) et la prolifération des cellules *in vivo* (19, 20), ainsi que l'activité RNase H des ribozymes.

30 La fixation d'oligonucléotides et des ribozymes sur les ARNm conduit à l'inhibition de la traduction dudit ARNm selon deux processus généraux, d'une part la dégradation de cet ARNm ou des duplexes ARN/ADN par la ribonucléase H cellulaire (RNase H) ou 35 par l'activité catalytique des ribozymes, d'autre part le blocage stérique de la machinerie cellulaire (1-9).

L'utilisation chimiquement modifiés permet d'améliorer leur incorporation par la cellule et leur résistance aux nucléases (10), notamment les 3'-exonucléases. Parmi, 5 les modifications chimiques d'oligonucléotides proposées dans l'art antérieur, la plus prometteuse semble être l'utilisation d'analogues structuraux des oligonucléotides phosphodiesters comme les oligonucléotides phosphorothioates. Ceux-ci résistent au 10 clivage par les nucléases et n'inhibent pas la dégradation par la RNase H (28). Ces avantages ont conduit à plusieurs études cellulaires et de pharmacocinétique (18, 29, 30) ainsi qu'à des essais cliniques de ces composés comme agents antitumoraux et 15 antiviraux (31). Mais, la mise en évidence d'effets non-spécifiques a limité considérablement l'enthousiasme de l'utilisation thérapeutique des oligonucléotides antisens (17, 32, 33).

En outre, une contrainte majeure de 20 l'utilisation de ces oligonucléotides modifiés réside dans le fait que les complexes d'hybridation entre l'ARN et l'oligonucléotide doivent être suffisamment stables pour ne pas être dissociés par la machinerie cellulaire. Ainsi, lorsque les oligonucléotides antisens ou les 25 ribozymes sont dirigés vers la région codante, ils sont séparés de leur cible par les ribosomes de la traduction (11-15). Cette dissociation peut être évitée en associant aux oligonucléotides des réactifs capables de réagir spontanément, ou après irradiation, avec l'ARN 30 cible (3-6, 10, 11).

On connaît par exemple la Demande de Brevet Internationale publiée sous le n° WO 90/12020 qui propose de coupler la furocoumarine à un oligonucléotide par l'intermédiaire d'un sucre ribose ou déoxyribose. 35 Les Demandes de Brevet Européen n° 316 016, Internationale n° WO 89/06702 et Allemand

n° 3928900 décrivent l'utilisation de conjugués de psoralène et d'oligonucléotides pour bloquer l'expression génétique. La demande de Brevet Français n° 2 568 254, décrit l'application de composés oligonucléotides liés à un agent intercalant pour le blocage sélectif d'une séquence d'acide nucléique, et plus particulièrement l'application de ces composés au blocage sélectif *in vivo* de l'expression d'un gène ou d'une séquence impliquée dans l'initiation, la propagation ou la terminaison de la réPLICATION d'un acide nucléique, de la transcription d'un ou plusieurs gènes et/ou de leur traduction.

Toutefois, ces méthodes chimiques présentent des inconvénients, car, l'induction de pontages par des agents chimiques s'accompagne souvent de réctions non spécifiques, et l'activation photochimique est difficile à mettre en oeuvre *in vivo*.

L'efficacité des oligonucléotides antisens et de ribozymes est également limitée, d'une part du fait de leur nature polyanionique qui conduit à des interactions non-spécifiques avec des molécules extracellulaires cationiques (21, 22), et d'autre part, en raison de leur faible diffusion au travers de la membrane plasmatische (23-25). Afin de palier ces inconvénients, il est proposé dans l'art antérieur d'utiliser, comme indiqué précédemment, des oligonucléotides chimiquement modifiés ou des systèmes de transport et de délivrance (27).

Les stratégies d'encapsulation des oligonucléotides et de ribozymes semblent constituer une meilleure approche que les modifications chimiques pour favoriser à la fois le transport et la stabilité d'oligonucléotides non-modifiés, tout en conservant leur spécificité d'hybridation. Ainsi, il a été réalisé, dans l'art antérieur, l'encapsulation d'oligonucléotides dans des liposomes, dans des immunoliposomes (34, 35) ou des

liposomes sensibles au pH (36). Il a été montré que l'encapsulation permet une protection relative des oligonucléotides contre les nucléases et augmente leur délivrance dans des cellules. Malgré ces avantages, 5 l'encapsulation d'oligonucléotides dans des liposomes n'est pas entièrement satisfaisante notamment en raison de problèmes dans le rendement d'encapsulation. Il a également été envisagé, dans l'art antérieur, que l'interaction entre des oligonucléotides conjugués au 10 cholestérol avec des LDL naturels, permet de prolonger la demi-vie plasmatique des oligonucléotides (38), de 1 à 10 minutes, et d'augmenter l'efficacité *in vitro* d'oligonucléotides antisens (39). Toutefois, la 15 préparation de LDL à partir de plasma humain et la faible stabilité des oligonucléotides ainsi associés demeurent des handicaps majeurs à leur utilisation thérapeutique.

Des lipides cationiques, comme le DOTMA ou 20 le DOTAP, déjà connus pour la transfection d'ADN, pourraient également constituer des transporteurs d'oligonucléotides (40, 41) et de ribozymes. Leur efficacité a été démontrée, et plus particulièrement les complexes oligonucléotides et DOTAP permettent une augmentation du transport et une diminution de la 25 dégradation intra et extra cellulaire des oligonucléotides (41). Mais la toxicité cellulaire de ces complexes limite leur utilisation dans des expériences *in vitro* (27, 42) ou pour une administration locale (43).

30 Plus récemment, l'adsorption d'oligonucléotides sur des nanoparticules de polyalkylcyanoacrylate a permis de renforcer la protection contre la dégradation par les nucléases (44). L'inhibition de la croissance néoplastique chez des 35 souris nudes a été observée avec une concentration d'oligonucléotides adsorbés sur ces nanoparticules,

100 fois plus faible qu'avec des oligonucléotides libres (45). Mais les possibilités d'utilisation systémique de ces véhicules n'ont pas été démontrées à ce jour.

5 Il n'existe donc à ce jour aucun système de transport, d'adressage et de protection efficace des oligonucléotides, antisens et ribozymes, permettant leur utilisation thérapeutique.

10 La Demanderesse a développé son expertise dans la préparation de vecteurs particulaires synthétiques, désignés sous le terme général de Biovecteurs Supramoléculaires (BVSM) ou Biovecteurs, capables de fixer, et avantageusement de vectoriser, différentes substances ou principes actifs, et donc 15 utiles pour la fabrication de compositions pharmaceutiques.

Un premier type de Biovecteurs Supramoléculaires, et son procédé de préparation, a été décrit dans le brevet européen No. 344 040.

20 Il s'agit de particules comprenant de l'intérieur vers l'extérieur :

25 - un noyau central hydrophile non liquide constitué d'une matrice de polysaccharides ou d'oligosaccharides naturellement ou chimiquement réticulés, pouvant être modifiés par des groupements ioniques divers;

30 - un couche d'acides gras greffés par des liaisons covalentes au noyau;
- une ou plusieurs couches lipidiques constituées notamment de phospholipides.

35 Les développements de cette première génération de Biovecteurs Supramoléculaires ont conduit la Demanderesse à concevoir et préparer de nouveaux Biovecteurs Supramoléculaires, aux propriétés améliorées notamment en fonction des principes actifs transportés. Les demandes de brevet internationales PCT publiées sous

les No. WO 92/21329, WO 92/21330, WO 94/23701, WO 94/20078 et WO 96 06 638 décrivent ces Biovecteurs Supramoléculaires, leur fabrication, leur association à divers principes actifs et leur utilisation pour la 5 préparation de compositions pharmaceutiques.

L'enseignement des demandes de brevets ci-dessus est incorporé dans la présente description par référence.

10 L'association d'un Biovecteur Supramoléculaire avec des oligonucléotides a été envisagée dans la demande de brevet internationale PCT No. WO 92/21330, dans le cadre d'un Biovecteur Supramoléculaire possédant un tropisme sélectif pour un type de cellule, et présentant donc la structure 15 particulière suivante :

- un noyau hydrophile non liquide,
- une première couche de nature lipidique liée au noyau par des liaisons covalentes,
- une seconde couche de phospholipides liée 20 à la première couche par des interactions hydrophobes,
- des molécules d'apolipoprotéine B greffées sur la couche de phospholipides ou de ligands protéiques ou peptidiques capables de reconnaître spécifiquement les récepteurs cellulaires des LDL.

25

La possibilité de l'association d'un Biovecteur Supramoléculaire avec des oligonucléotides a également été présentée par les Inventeurs lors du "21st International Symposium on Controlled release of Bioactive Materials", qui s'est tenu du 27 au 30 Juin 30 1994 à Nice (France). Lors de cette présentation, il a été proposé d'utiliser des Biovecteurs Supramoléculaires pour augmenter l'efficacité thérapeutique d'oligonucléotides non modifiés. Les Biovecteurs 35 Supramoléculaires envisagés étaient du type décrit dans la demande de brevet internationale PCT WO 92 21 329

c'est à dire constitués d'un noyau de polysaccharides réticulés par l'épichlorhydrine, fonctionnalisé par du chlorure de glycidyltriméthylammonium afin de faire apparaître des charges positives, et recouvert d'une 5 première couche d'acides gras et d'une seconde couche lipidique. Il était proposé d'associer les noyaux acylés aux oligonucléotides par simple mélange en milieu aqueux, puis de réaliser la couche externe lipidique par mélange des noyaux acétylés associés aux 10 oligonucléotides avec une solution de lipide.

Les travaux de recherche menés par la Demandérresse depuis ce symposium, lui ont permis de mettre en évidence, comme indiqué dans les exemples 15 rapportés ci-après, que l'efficacité d'une association d'un Biovecteur Supramoléculaire et d'oligonucléotides ne relevait pas d'une simple incorporation des oligonucléotides dans le Biovecteur Supramoléculaire, mais nécessite la formation d'un conjugué ionique qui doit être stable dans un milieu biologique présentant 20 les caractéristiques ioniques du plasma sanguin, et permettre le transport, la protection et l'adressage d'oligonucléotides, antisens ou ou ribozymes, dans les cellules et avantageusement dans leur cytoplasme. En 25 outre, il s'agit de préparer des conjugués dont le taux d'association d'oligonucléotides est maximal afin d'assurer l'efficacité optimale de l'effet désiré.

Or, un tel conjugué ionique stable établi entre, d'une part les charges positives du noyau et, 30 d'autre part, des oligonucléotides polyanioniques, ne peut être obtenu que si le taux de réticulation de la matrice et le niveau de charges positives du noyau sont rigoureusement définis.

Les travaux ayant conduit à la présente 35 invention ont été réalisés grâce aux connaissances de la Demandérresse sur les procédés de fabrication des

Biovecteurs Supramoléculaires, qui lui ont permis d'étudier les possibilités de modulation du degré de réticulation de la matrice polysaccharidique et d'ajustements du niveau de charges cationiques du noyau.

5 L'invention a donc pour but de fournir de nouveaux moyens de transport, de protection et d'adressage d'oligonucléotides dans les cellules, notamment à des fins thérapeutiques. Ce but est atteint grâce à un nouveau conjugué ionique, stable dans un 10 milieu biologique, d'un vecteur particulaire comportant au moins un noyau hydrophile non liquide cationique et d'oligonucléotides polyanioniques, permettant de transporter dans les cellules et de protéger lesdits oligonucléotides capables de s'hybrider avec un ARNm 15 cellulaire.

L'invention se rapporte plus particulièrement à un conjugué d'un vecteur particulaire et d'oligonucléotides, caractérisé en ce que le vecteur particulaire comprend au moins un noyau hydrophile non liquide constitué d'une matrice de polysaccharides ou d'oligosaccharides naturellement ou chimiquement réticulés et modifiés par des ligands cationiques, dont le taux de charges positives est compris entre environ 20 0,6 et 1,8 milliEquivalent de charges positives par gramme de noyau et le taux de réticulation est sensiblement celui obtenu par réticulation avec entre 5 et 20% de mole d'épichlorhydrine par mole d'ose dans les 25 polysaccharides ou oligosaccharides, et en ce que ledit vecteur particulaire est conjugué par des liaisons ioniques stables en milieu biologique à des oligonucléotides polyanioniques protégés par ledit vecteur particulaire, lesdits oligonucléotides étant 30 capables de s'hybrider à un ARNm cellulaire.

Les résultats rapportés dans les exemples ci-après montrent les propriétés remarquables des conjugués selon l'invention. Plus particulièrement, il a été observé que :

5 - la quantité d'oligonucléotides conjuguée au vecteur particulaire est au moins égale et souvent très supérieure à celle possible avec les systèmes de simple transport de l'art antérieur; en effet, de l'ordre de 1000 copies d'un oligonucléotide peuvent être 10 conjuguées au vecteur particulaire;

15 - la demi-vie d'oligonucléotides dans le conjugué de l'invention est augmentée d'environ 8 fois par rapport à celle d'oligonucléotides libres;

20 - l'internalisation des conjugués de l'invention dans les cellules permet d'augmenter d'environ 30 fois la quantité d'oligonucléotides passant la membrane cellulaire en 5 heures, et d'environ 10 fois la quantité d'oligonucléotides dans le cytosol desdites cellules.

25 Les travaux réalisés par la Demandereesse sur les vecteurs particulaires et la préparation du conjugué de l'invention, ont permis d'obtenir, de manière surprenante par rapport aux spéculations de l'art antérieur, des taux et des rendements d'association optimaux, puisque la Demandereesse est parvenue, dans des conditions optimales, à conjuguer 100% des oligonucléotides mélangés aux vecteurs particulaires. Ces conditions optimales sont de l'ordre de 0 à 0,3 g 30 d'oligonucléotides par gramme de vecteurs.

35 Le vecteur particulaire du conjugué de l'invention comporte au moins un noyau hydrophile non liquide, dont la taille est généralement comprise entre 10 nm et 5 μ m et qui est constitué, de préférence, d'une matrice de polysaccharides ou d'oligosaccharides

naturellement ou chimiquement réticulé portant une charge globale cationique.

5 Les polysaccharides de la matrice sont choisis dans le groupe comprenant le dextrane, l'amidon, la cellulose, leurs dérivés et substitués, leurs produits d'hydrolyse et leurs sels et esters.

10 Une caractéristique essentielle du noyau, adaptée à la formation de conjugués avec des oligonucléotides, réside dans le taux de réticulation de la matrice. Ce taux de réticulation est défini par référence à la capacité de réticulation d'une quantité définie d'épichlorhydrine, qui est un agent de réticulation bien connu et décrit dans les demandes de brevet de la Demanderesse citées précédemment. Le taux 15 de réticulation de la matrice permettant la réalisation des conjugués de l'invention est obtenu par réaction avec entre 5 et 20% de mole d'épichlorhydrine par mole d'ose dans les polysaccharides ou oligosaccharides constituant la matrice du noyau.

20 Ce niveau de réticulation est déterminant pour assurer la stabilité du conjugué de l'invention dans les liquides biologiques du type du plasma sanguin. Or, sans cette stabilité, l'efficacité *in vivo* et *in vitro* des conjugués de l'invention pour transporter et 25 adresser les oligonucléotides dans les cellules cibles serait considérablement diminuée.

30 Une autre caractéristique essentielle de la matrice hydrophile du noyau est d'être ionisée positivement. Cette ionisation cationique est obtenue par greffage, sur la matrice hydrophile, de ligands portant des fonctions chargées positivement.

35 Le taux de charges positives du noyau constitue, comme le taux de réticulation de la matrice hydrophile, une caractéristique essentielle du conjugué dont dépend son efficacité. Le caractère cationique du noyau est en effet indispensable à la formation du

conjugué ionique de l'invention avec des oligonucléotides polyanioniques. Mais ce caractère cationique doit être rigoureusement défini de façon à assurer la fonctionnalité du conjugué dans une stratégie 5 thérapeutique. Ainsi, les travaux de recherche menés par la Demandereuse ont établi que le noyau doit posséder entre 0,6 à 1,8 milliEquivalent et de préférence de 0,8 à 1,6 milliEquivalent de charges positives par gramme de noyau pour assurer un niveau de conjugaison efficace 10 avec les oligonucléotides.

Les taux de réticulation et de charges positives du noyau définis ci-dessus sont déterminants pour obtenir la conjugaison maximale entre le vecteur et les oligonucléotides, et assurer la stabilité et la 15 faible toxicité des conjugués de l'invention.

Selon une forme de réalisation particulière de l'invention, le noyau hydrophile non liquide est recouvert en totalité ou en partie d'au moins une couche 20 de composés amphiphiles. Avantageusement ces composés amphiphiles sont choisis parmi les lipides et phospholipides naturels ou synthétiques, les céramides, les acides gras, les glycolipides, les lipoprotéines et les tensioactifs. L'invention envisage plus 25 particulièrement, des vecteurs particulaires dont le noyau hydrophile non liquide est recouvert en totalité ou en partie d'une couche externe constituée :

- essentiellement de phospholipides naturels ou synthétiques et/ou de céramides, éventuellement associés à d'autres composés amphiphiles, ou
- d'acides gras naturels fixés au noyau par des liaisons covalentes.

Une autre forme de réalisation d'un conjugué de l'invention consiste à utiliser des Biovecteurs du type décrit dans le brevet européen No. 344 040, c'est à 35 dire comportant un noyau central précédemment défini, recouvert en totalité ou en partie de deux couches de

composés amphiphiles. Les composés amphiphiles sont ceux décrits précédemment. Dans cette forme de réalisation, on préfère plus particulièrement le cas d'un noyau central recouvert en totalité ou en partie d'une première couche d'acides gras, elle-même recouverte en totalité ou en partie d'un couche lipidique.

La mise en oeuvre de vecteurs particulaires comportant au moins une couche amphiphile permet avantageusement d'associer au conjugué de l'invention un principe actif supplémentaire utile pour le transport, l'adressage ou la présentation du conjugué au niveau de la membrane de la cellule, dans le cytoplasme ou lors de l'hybridation avec un ARNm cible. Mais l'association d'un principe actif supplémentaire peut être également réalisée au niveau du noyau du vecteur particulier du conjugué.

Les oligonucléotides conjugués au vecteur particulier de l'invention sont des oligodésoxyribonucléotides ou oligoribonucléotides naturels ou modifiés, éventuellement marqués, comportant de l'ordre de 5 bases jusqu'à une centaine de bases. De tels marquage(s) et/ou modification(s) sont acceptable dans le cadre de l'invention, s'ils ne changent pas substantiellement le caractère polyanionique de l'oligonucléotide. Les oligonucléotides conjugués au vecteur particulier de l'invention couvrent également les antisens et les ribozymes. Le vecteur particulier selon l'invention peut être conjugué à plusieurs dizaines jusqu'à de l'ordre de 1000 copies d'un même oligonucléotide, ou être conjugué à plusieurs oligonucléotides de séquences différentes, et dans ce cas, chaque oligonucléotide de séquence différente doit être présent à environ de l'ordre de 100 copies.

L'invention se rapporte aussi à des compositions pharmaceutiques comprenant un ou plusieurs conjugués selon l'invention ou leurs sels pharmaceutiquement acceptables, dispersés dans des excipients pharmaceutiquement acceptables. Ces compositions pharmaceutiques peuvent être par exemple administrées par voie systémique ou encore être appliquées localement, les excipients ou véhicules utilisés sont choisis pour être compatibles avec le mode d'administration ou d'application retenu.

L'invention concerne également le conjugué défini précédemment destiné à être utilisé pour adresser un oligonucléotide dans une cellules et notamment dans le cytoplasme.

L'invention a en outre pour objet les vecteurs particulaires mis en oeuvre dans les conjugués décrits précédemment. Ces vecteurs particulaires sont du type comprenant au moins un noyau hydrophile non liquide cationique constitué d'une matrice de polysaccharides ou d'oligosaccharides naturellement ou chimiquement réticulés portant une charge globale cationique et présentant au moins une des caractéristiques suivantes :

- le taux de réticulation est sensiblement celui obtenu par réticulation avec entre 5 et 20% de mole d'épichlorhydrine par mole d'ose dans les polysaccharides ou oligosaccharides;

- ladite matrice de polysaccharides ou d'oligosaccharides naturellement ou chimiquement réticulés est modifiée par des ligands cationiques, dont le taux de charges positives est compris entre 0,6 et 1,8 milliEquivalents et avantageusement entre 0,8 et 1,6 milliEquivalent de charges positives par gramme de noyau.

Selon une forme de réalisation particulière du vecteur particulaire de l'invention, le noyau hydrophile non liquide est recouvert en totalité ou en partie d'au moins une couche de composés amphiphiles. 5 Avantageusement ces composés amphiphiles sont choisis parmi les lipides et phospholipides naturels ou synthétiques, les céramides, les acides gras, les glycolipides, les lipoprotéines et les tensioactifs. L'invention envisage plus particulièrement, des vecteurs 10 particulaires dont le noyau hydrophile non liquide est recouvert en totalité ou en partie d'une couche externe constituée :

- essentiellement de phospholipides naturels ou synthétiques et/ou de céramides, éventuellement 15 associés à d'autres composés amphiphiles, ou
- d'acides gras naturels fixés au noyau par des liaisons covalentes.

Les résultats rapportés dans les exemples 20 ci-après, montre qu'un vecteur particulaire comprenant au moins un noyau hydrophile non liquide cationique, est avantageusement utilisable pour adresser des oligonucléotides au cytoplasme d'une cellule.

Comme indiqué précédemment, les 25 oligonucléotides adressées dans le cytoplasme d'une cellule sont des oligoribonucléotides ou oligodésoxyribonucléotides, antisens ou ribozymes, éventuellement marqués, naturels ou modifiés dès lors que le marquage ou la modification ne change pas 30 substantiellement le caractère polyanionique des oligonucléotides.

L'invention concerne également les procédés de préparation des conjugués ioniques définis 35 précédemment. En effet, les procédés décrits dans l'art antérieur ne permettent pas d'obtenir des conjugués

5 présentant toutes les propriétés requises pour une stratégie antisens ou ribozyme. Les travaux de recherche réalisés par la Demanderesse sur la préparation de conjugués lui ont permis de définir des procédés permettant d'obtenir de façon reproductible des conjugués fonctionnels.

Un tel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

10 a) la préparation du noyau cationique :

15 - en mélangeant un polymère hydrophile, de nature polysaccharidique ou oligosaccharidique, chimiquement ou naturellement réticulé avec un agent de réticulation dans un rapport compris entre 0,06 et 0,2 mole, et de préférence entre 0,1 et 0,15 mole, d'agent de réticulation par unité d'ose dans le polysaccharide ou l'oligosaccharide,

20 - en ajoutant au mélange ci-dessus un ligand cationique de façon à obtenir un taux de charge du noyau compris entre 0,6 et 1,8 et de préférence entre 0,8 et 1,6 millEquivalent par gramme de noyau;

25 b) le chargement des oligonucléotides polyanioniques :

30 - en ajoutant, sous agitation, au noyau préparé à l'étape (a), entre environ 0,02 et 0,4 gramme, et de préférence entre 0,05 et 0,2 gramme, d'oligonucléotide par gramme de noyau, selon un débit compris entre environ 0,25 µg d'oligonucléotide par mg de noyau et par heure et 6mg par mg de noyau et par heure, et de préférence entre 4 µg/mg/heure et 1 mg/mg/heure, à une température comprise entre environ 20°C et 60°C et de préférence entre 40°C et 50°C.

35 Selon le type de vecteur particulaire entrant dans la composition du conjugué de l'invention, le procédé ci-dessus peut comprendre des aménagements à l'étape (a).

5 Pour la préparation de vecteur particulaire dont le noyau est recouvert en totalité ou en partie d'une ou deux couches de composés amphiphiles, l'étape (a) comprend en outre, le greffage sur le noyau ou la couche sous-jacente d'une couche constituée de composés amphiphiles.

Il peut s'agir du greffage :

- d'une couche d'acides gras, liée au noyau par des liaisons covalentes, et/ou

10 - d'un feuillet externe capable de modifier le comportement cellulaire du conjugué de l'invention, constitué, par exemple de phospholipides zwitterioniques associés ou non à des lipides anioniques et/ou cationiques, lié à la couche sous-jacente ou au noyau par des liaisons hydrophobes et/ou ioniques et/ou 15 hydrogènes.

Une forme de mise en oeuvre préférée de l'étape (b) du procédé de l'invention consiste à ajouter à des vecteurs particulaires préparés conformément à 20 l'étape (a), dont la concentration exprimée en noyau cationique est comprise entre 1 et 20 mg/ml, une solution d'oligonucléotides à une concentration comprise entre 1 et 20 mg/ml, de façon à obtenir un rapport oligonucléotides/vecteurs particulaires compris entre 2 25 et 40%, et de préférence entre 5 et 20%, selon une cinétique d'ajout de la solution d'oligonucléotides comprise entre 5 µl/ml/h et 300 µl/ml/h, et à une température d'incubation comprise entre 20°C et 60°C, et préférentiellement entre 40°C et 50°C,

30 D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront des exemples qui suivent qui concernent la préparation et l'utilisation des vecteurs particulaires et des conjugués de l'invention et qui se 35 réfèrent aux dessins en annexe dans lesquels :

- La figure 1 représente l'effet de la densité de charge sur la cytotoxicité des NPS cationiques. Des NPS cationiques possédant différentes densités de charges sont incubés avec des cellules HL60.

5 Après 72 heures d'incubation la viabilité cellulaire est déterminée par un test au MTT.

- La figure 2 représente l'effet du taux de réticulation (rapport épichlorhydrine/unités ose) sur la cytotoxicité des NPS cationiques. Des NPS cationiques (1,4 mEq/g) possédant différents taux de réticulation sont incubés avec des cellules HL60. Après 72 heures d'incubation la viabilité cellulaire est déterminée par un test au MTT.

- La figure 3 représente l'effet de la réticulation sur les caractéristiques des conjugués Antisens Biovecteur. Des NPS cationiques (1,4 mEq/g) possédant différents taux de réticulation sont conjugués à des Antisens. Après conjugaison les rendements d'association (■) et la stabilité en PBS (phosphate Buffered Saline) (▲) sont déterminés en fonction du taux de réticulation de NPS.

- La figure 4 représente les cinétiques de dégradation des oligonucléotides dans différents milieux. Des oligonucléotides libres (symboles vide) ou conjugués au biovecteurs (symboles pleins) sont incubés dans du milieu de culture complémenté en sérum (■;□), milieu de culture complémenté en sérum inactivé (▲;△) et en plasma humain (●;○). Après incubation, les échantillons sont analysés par électrophorèse (20% PAGE) et autoradiographie. La quantité d'oligonucléotides non dégradés est exprimée en pourcentage du témoin (T0).

- La figure 5 représente la cinétique de pénétration des oligonucléotides dans les cellules. Des cellules MCF7 sont incubées avec des oligonucléotides

5 libres (■;□) ou conjugués aux biovecteurs (▲;△). Deux concentrations différentes d'oligonucléotide sont utilisées, 0,8 µg/ml (□;▲) et 6,2 µg/ml (■;□). Après différents temps d'incubation, la pénétration cellulaire des oligonucléotides étaient déterminée par cytométrie en flux.

10 - La figure 6 représente l'activité cellulaire des conjugués Antisens biovecteurs. Des oligonucléotides Antisens ciblant l'oncogène c-myc (15 mers phosphorothioate) sont conjugués à des biovecteurs. Ces oligonucléotides libres ou conjugués aux biovecteurs ainsi que les biovecteurs libres sont incubés avec 5 x 10⁴ cellules HL60. A différents temps d'incubation, la prolifération cellulaire est déterminée par un test 15 MTT. Les résultats sont exprimés en Densité Optique à 570 nm.

20 - La figure 7 représente l'activité cellulaire des conjugués Ribozymes/Biovecteurs. Des oligonucléotides Ribozymes ciblant l'oncogène c-myb (35 mers) sont conjugués à des biovecteurs ou à de la Lipofectamine. Ces Ribozymes libres ou conjugués (figure 7a), ainsi que différents contrôles, conjugués Biovecteurs Ribozyme inactif, conjugués Biovecteurs Scrambled Ribozyme, conjugué Ribozyme inactif 25 Lipofectamine et biovecteur libre (figure 7b), sont incubés avec 2 x 10⁵ cellules. Les résultats sont exprimés en pourcentage de prolifération cellulaire par rapport au contrôle (cellules non traitées)

30 - La figure 8 représente l'inhibition spécifique de la synthèse d'une protéine par un antisens phosphorothioate (ODM-PO) ou phosphodiester (ODM-PD) conjugué aux biovecteurs. L'inhibition de la production de P185-erb2 est mesurée après incubation de cellules SK-Br3 avec différentes préparations d'oligonucléotides. 35 Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition

par rapport au contrôle (cellules non traitées). Dans cette figure les abréviations des différentes préparations d'oligonucléotides ont les significations suivantes : SMBV = Biovecteur vide ; SMBV-AS = Conjugué Biovecteur antisens ; SMBV-SC = Conjugué Biovecteur "scramble" ; DOTAP = DOTAP seul ; DOTAP-AS = Conjugué antisens Biovecteur ; DOTAP-SC = Conjugué DOTAP "scramble" ; Control = Cellules seules ; Control-AS = Antisens libres ; Control-SC = "Scramble" libre.

- La figure 9 représente l'inhibition de la prolifération d'une lignée SK-Br3 par des conjugués biovecteurs Antisens anti erb2. La prolifération de cellules SK-Br3 est déterminée après incubation des cellules avec un antisens anti erb2 conjugué des biovecteurs. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules en fonction du temps. Le contrôle correspond à des cellules traitées en absence d'oligonucléotide et de biovecteur.

Exemple 1 : Préparation de Noyaux Polysaccharidiques Cationiques possédant différents taux de charge.

Dans un réacteur de 3 litres, on solubilise 100g de Glucidex 2 (Roquette, France) dans 0.2 litres de NaOH 2N. Lorsque la solution est homogène, on introduit l'agent de réticulation, epichlorhydrine (Fluka, Suisse), avec un rapport molaire (mole d'epichlorhydrine/mole d'unité glucose) de 10%. Après la fin de l'addition, la préparation est maintenue sous agitation pendant 12 heures à 20°C. On ajoute ensuite le Glycidyl Triméthylammonium Chloride (GTMA, Fluka, Suisse). De façon à obtenir différents taux de charge, plusieurs rapports molaires GTMA/ unité glucose sont utilisés (Table 1). Lorsque tout le GTMA est ajouté, on laisse la préparation sous agitation pendant 8 heures à 20°C. Le gel ionique obtenu est ensuite dispersé dans 2

litres d'eau osmosée, neutralisé avec de l'acide acétique et homogénéisé par un homogénéisateur Rannie (type Minilab 8:30) à une pression de 1000 bars.

5 Les Noyaux Polysaccharidiques (NPS) ainsi obtenus sont ultrafiltrés sur une membrane de 30 Kd (Incelltech, France) et filtrés sur une cartouche 0.45 µm (Millipore, France).

10 Dans le tableau 1 ci-dessous, le taux de charge des NPS obtenus est déterminé par analyse élémentaire du taux d'azote présent dans le gel.

Tableau 1

Numéro	Rapport GTMA/unité glucose (%)	Charge finale (mEq/g)
NPS-1	26	0,8
NPS-2	29	1,0
NPS-3	38	1,2
NPS-4	50	1,4

15 Ainsi en modulant le rapport initial GTMA/unité glucose il est possible de moduler la densité de charge des NPS cationiques.

20 Ces travaux et ceux réalisés sur d'autres polysaccharides, ont permis de démontrer qu'il est possible de modifier la densité de charge des NPS dans une gamme de 0 à 2 mEq/g correspondant à un rapport GTMA/unité glucose de 0 à 70%. Pour la synthèse des conjugués de l'invention, il est nécessaire que la charge soit comprise entre 0,6 et 1,8 mEq/g et de façon préférentielle entre 0,8 et 1,6 mEq/g.

25 Exemple 2 : Préparation de Noyaux Polysaccharidiques Cationiques possédant différent taux de réticulation.

30 Le tableau 2 ci-dessous rapporte les différents NPS cationiques préparés selon l'exemple 1 avec des rapports molaires epichlorhydrine/unité glucose variable et un rapport GTMA/unité glucose constant (50%) permettant d'obtenir une charge de 1,4 mEq/g de gel.

Tableau 2

5

Numéro	Rapport Epichlorhydrine/unité glucose (%)
NPS-5	0
NPS-6	6,7
NPS-7	10,0
NPS-8	12,5
NPS-9	16,7

10

Ces travaux et ceux réalisés sur d'autres polysaccharides, ont permis de démontrer que les rapports utilisables sont compris entre 0 et 20% correspondant à la modification d'une unité glucose sur cinq. Pour la préparation des conjugués de l'invention le rapport est compris entre 6 et 20%, et préférentiellement entre 10 et 15%.

15

Exemple 3 : Préparation de Biovecteur Supramoléculaire dit "SMBV-light".

20

La préparation des biovecteurs se déroule en deux étapes principales : (1) la synthèse des Noyaux polysaccharidiques (NPS) cationiques, (2) l'association de lipides aux NPS, dite synthèse des biovecteurs (type light).

(1) Synthèse des NPS cationiques.

25

500 g de maltodextrines Glucidex (ROQUETTE) sont solubilisés avec 0.880 litres d'eau dans un réacteur thermostaté à 20°C sous agitation. Puis, l'on introduit environ 7 g de NaBH₄ et on laisse 1 heure sous agitation.

30

220 ml de NaOH 10M sont rajoutés puis 30,25 ml d'épichlorhydrine (Fluka). Après 12 heures de réaction, 382,3 g de glycidyltriméthylammonium chloride

(Fluka) sont introduits et le mélange est maintenu sous agitation durant 10 heures.

Le gel est dilué avec 8 litres d'eau déminéralisée et neutralisé à l'acide acétique glacial.

5 L'hydrogel obtenu est broyé par l'intermédiaire d'un homogénéisateur à haute pression (RANNIE Lab). La pression exercée est de 400 bars. A l'issue de cette étape, les matrices dispersées ont un diamètre moyen de 60 nm.

10 La purification s'opère par des étapes successives de :

- microfiltration 0,45 µm pour éliminer les particules de taille trop importante, et

15 - diafiltration à volume constant pour éliminer les petites molécules (sels, fragments polysaccharidiques).

Enfin, les NPS sont concentrés, récupérés dans des flacons stériles et conservés à -20°C.

20 (2) Synthèse des biovecteurs.

Les noyaux polysaccharidiques cationiques décongelés sont dilués avec de l'eau osmosée dans un réceptacle en verre dans la proportion de 1mg de NPS /1ml d'eau. La dispersion est placée dans un premier temps sous agitation magnétique (5-10 minutes) puis 25 homogénéisée (RANNIE Minilab) à 400 bars durant 3 minutes. La dispersion de NPS est placée dans un bain-marie à 80°C.

30 Les lipides (exemple : mélange de lécithine de jaune d'oeuf/cholestérol), sous forme de poudre, sont pesés de telle sorte que la masse totale représente, par exemple 20% (w/w) de la masse des NPS. Les lipides constitutifs de la membrane sont mélangés et solubilisés

avec 2 ml d'éthanol 95% (v/v). Les lipides chargés représentent, par exemple, 5 % (w/w) des lipides totaux.

5 L'homogénéisateur, est amené à une température de 60°C minimum par circulation d'eau en circuit fermé.

Concomitamment, les NPS dispersés à 80°C sont soumis à une agitation magnétique et la solution éthanolique de lipide est injectée dans la dispersion de NPS.

10 L'eau de chauffage de circuit du l'homogénéisateur est évacuée et remplacée par la dispersion "NPS/lipides" à 80°C. Cette nouvelle dispersion est homogénéisée à 450 bars pendant 25 minutes en circuit fermé à 60°C minimum. A l'issue de 15 cette étape, la préparation est introduite dans un ballon en verre puis soumise à basse pression à 60°C pour éliminer l'éthanol resté en solution. SI nécessaire, les biovecteurs obtenus peuvent être concentrés par ultrafiltration, lyophilisation ou 20 évaporation.

Les biovecteurs cationiques ainsi obtenus sont alors entreposés dans des conditions stériles après filtration sur 0,2 µm.

25 Exemple 4 : Préparation de Biovecteur Supramoléculaire dit "SMBV-complet".

La préparation d'un SMBV-complet est celle décrite dans la demande de brevet européen No. 344 040, avec lécithine de jaune d'oeuf /cholestérol (80/20 p/p)- 30 rapport Lipide/NPS 100%.

Dans ce mode de réalisation, on prépare les Biovecteurs Supramoléculaires dit "NPS" de l'exemple 3, que l'on soumet à une étape d'acylation pour obtenir des

NPS acylés. Après phospholipidation, on obtient les SMBV-complets.

5

Exemple 5 : Cytotoxicité des Noyaux
Polysaccharidiques cationiques.

Protocole.

Différentes suspensions de NPS cationiques
10 sont diluées dans un milieu de culture cellulaire (RPMI 1640, Gilco, France). Les suspensions obtenues sont alors mixées avec un volume équivalent de suspension cellulaire (100 μ L de Cellule HL60 à $5 \cdot 10^4$ Cellules/ml). Les suspensions cellulaires ainsi préparées sont
15 incubées 72 heures à 37°C dans un incubateur avec 5% de CO₂.

Après incubation, les cellules sont lavées en PBS (10mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 130 mM NaCl, 2 mM KCl, pH 7,4) et la viabilité cellulaire est déterminée par un
20 test au MTT.

Chaque résultat est la moyenne de 2 expériences indépendantes effectuées sur six points d'expérimentation.

25

a) Effet de la charge des Noyaux
Polysaccharidiques.

30

Les NPS de l'exemple 1 (rapport initial Epichlorhydrine/unité glucose de 10%) ont été utilisés pour montrer l'effet de charge sur la Cytotoxicité des NPS cationiques.

35

La figure 1 montre les courbes de réponse obtenues sur la lignée HL60 et pour des densités de charge comprise entre 0,8 et 1,4 mEq/g. Il apparaît que la toxicité cellulaire des NPS est observée pour des concentrations comprises entre 10 et 150 μ g/ml (IC20 après 3 jours d'incubation.). Cependant, celle ci peut

être modulée par la densité de charges cationiques des NPS.

5

b) Effet du taux de réticulation.

La figure 2 donne les courbes de cytotoxicité obtenues avec les cellules HL60 et les NPS cationiques de l'exemple 2. Pour cette densité de charge (1,4 mEq/g) et pour des taux de réticulation variant de 0 à 16,7%, la toxicité cellulaire est observée pour des concentrations allant de 10 à 150 µg/ml (IC20). De même que pour l'effet de charge, la réticulation apparaît comme un paramètre important de la toxicité cellulaire des NPS cationiques.

c) Effet synergique de la Charge et du Taux de réticulation.

Le tableau 3 ci-dessous résume les résultats de Cytotoxicité observés sur lignée HL60 après 72 heures d'incubation pour différents NPS cationiques qui diffèrent par leur densité de charge et leur taux de réticulation. Les résultats sont exprimés en IC20, concentration de NPS qui inhibe 20% de la prolifération cellulaire 72 heures après incubation.

Tableau 3

Numéro	Polysaccharide	Taux de réticulation* (%)	Charge (mEq/g)	IC20 (µg/ml)
NPS-1	Glucidex 2	10,0	0,8	>150
NPS-2	Glucidex 2	10,0	1,0	90
NPS-3	Glucidex 2	10,0	1,2	48
NPS-4	Glucidex 2	10,0	1,4	12
NPS-5	Glucidex 2	0	1,4	76
NPS-6	Glucidex 2	6,7	1,4	17
NPS-7	Glucidex 2	10,0	1,4	10
NPS-8	Glucidex 2	12,5	1,4	8

NPS-9	Glucidex 2	16,7	1,4	4
NPS-10	Tackidex	12,5	1,9	3
NPS-11	Tackidex	12,5	1,6	5
NPS-12	Tackidex	20,0	0,5	>150
NPS-13	Glucidex 6	20,0	0,7	36
NPS-14	Glucidex 2	12,5	0,8	>150
NPS-15	Glucidex 2	0	1,0	>150

(*rapport initial épichlorhydrine/unité glucose) et différentes charges des NPS cationiques.

5 Ces résultats indiquent qu'il existe un effet synergique entre Cytotoxicité induite par la densité de charge et par le taux de réticulation des NPS cationiques. Ainsi, il est possible de moduler la toxicité cellulaire des NPS cationiques en modulant les conditions de synthèse de ces NPS.

10 Pour la préparation des conjugés oligonucléotides/biovecteurs, la recherche d'une toxicité minimale et d'un rendement maximal d'association doit conduire à l'obtention d'un compromis. Celui-ci, peut-être réalisé pour des charge comprises être 0.8 et 1.6 mEq/g et des taux de réticulation de 10 à 15%.

Exemple 6 : Chargement d'Oligonucléotide dans des NPS cationiques.

Méthodes.

20 Une solution d'oligonucléotide (antisens de 15 mer) à 2,5 mg/ml en eau est lentement ajoutée (5µl/ml toutes les heures) à une solution de NPS cationiques à 1 mg/ml maintenue à 45°C sous agitation magnétique. Ainsi, le rapport Oligonucléotide/NPS est de 5% (p/p). 25 Après le dernier ajout d'oligonucléotide la préparation est incubée 1 heure sous agitation magnétique à 45°C.

30 La concentration en oligonucléotides libres est déterminée par spectrophotométrie après ultrafiltration des préparations. De même, afin de déterminer la stabilité du complexe vis à vis de la force ionique, la préparation est incubée en PBS (10 mM

NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, NaCl 130 mM, KCl 2 mM, pH 7.4). Après cette incubation (30 min. à 37°C), les oligonucléotides libres et associés au NPS sont séparés par ultrafiltration et la concentration est déterminée par spectrophotométrie.

5

a) Effet de la charge des NPS cationiques.

10

La table 4 ci-dessous résume les résultats d'association obtenus pour différentes charges des NPS cationiques (0,6; 0,9 et 1,6 mEq/g) et montre l'influence de charge des NPS cationiques sur les rendements d'association et la stabilité en PBS des complexes oligonucléotide-NPS.

Tableau 4

	0,6 mEq/g (n=9)	0,9 mEq/g (n=2)	1,6 mEq/g (n=9)
Rdt D'association (%)	61,8 ± 11,5	80,2 ± 12,4	89,7 ± 6,0
ODN libre après PBS (%)	73 ± 14	78 ± 8	46 ± 9

15

Les résultats obtenus indiquent qu'il existe une relation étroite entre la charge des NPS et la qualité des conjugués NPS-oligonucléotide mesurée par les rendements d'association et leurs stabilités après incubation en PBS.

20

b) Effet du taux de réticulation.

La figure 3 donne les résultats obtenus lorsque les NPS de l'exemple 2 sont utilisés dans le protocole d'association.

25

Ces résultats indiquent que pour la charge utilisée, 1,4 mEq/g, le taux de réticulation a peu d'influence sur les rendements d'association. A l'inverse l'augmentation du rapport épichlorhydrine/unité de glucose permet d'améliorer progressivement la stabilité du complexe après incubation en PBS.

30

Ainsi, la synthèse du NPS optimal pour la formation des conjugués doit correspondre à un compromis entre la densité de charge du NPS et la réticulation du

polysaccharide afin de maximaliser les qualités du conjugué oligonucléotide-biovecteur et à minimaliser la toxicité cellulaire de ceux-ci.

5 Exemple 7 : Obtention d'un protocole non-agrégratif lors de la préparation des conjugués oligonucléotide-biovecteurs.

10 Des biovecteurs préparés comme dans l'exemple 4 sont conjugués à des oligonucléotides (antisens de 18 -mères) en utilisant le protocole décrit dans l'exemple 6 avec un rapport Oligonucléotide/NPS de 10%. Cependant l'apport d'énergie est effectué suivant deux méthodes :

15 Méthode 1 : Les oligonucléotides sont ajoutés à température ambiante dans un bain à ultrasons.

 Méthode 2 : L'ajout des oligonucléotides est effectué sous agitation magnétique à 45°C.

20 La méthode 1 aboutit à une agrégation des Biovecteurs, indiquant que les ultrasons ne sont pas suffisants pour dissocier les agrégats Biovecteurs/oligonucléotide. A l'inverse, la méthode 2 aboutit à un protocole de conjugaison non-agrégratif permettant d'obtenir des suspensions homogènes.

25 Exemple 8 : Préparation d'un conjugué d'oligonucléotide et de Biovecteur

30 La tableau 5 ci-dessous donne les caractéristiques des conjugués Oligonucléotide-Biovecteur obtenus en utilisant un oligonucléotide antisens [OligoDeoxyNucléotide (ODN) de 15 -mères] ou un Ribozyme (OligoRiboNucléotide (ORN) de 35 -mères), et les biovecteurs décrits à l'exemple 3 dont les NPS possèdent des caractéristiques définies (par exemple une charge de 0,8 mEq/g et un taux de réticulation de 35 12,5 %).

Le protocole d'association utilisé correspond au protocole de l'exemple 6. Cependant, la solution d'oligonucléotide est ajoutée à raison de 10 μ l/ml, toutes les heures pour 4 heures d'incubation.

5 Ainsi, le rapport oligonucléotide/NPS est maintenu à 10%.

Tableau 5

	Ribozyme	Antisens
Rendement d'association (%)	98,0 \pm 2,0	99,3 \pm 2,1
Oligonucléotide libre après PBS (%)	9,3 \pm 3,6	5,3 \pm 3,5
Filtrabilité (%)	95,0 \pm 2,4	98,2 \pm 2,4
Diamètre moyen (nm)	89 \pm 3	85 \pm 5

10 Les résultats montrent que la nature des oligonucléotides, en particulier leur taille (nombre de mères) et leur structure (antisens versus Ribozyme), a peu d'influence sur les caractéristiques des conjugués oligonucléotides-biovecteurs. De plus, ces résultats confirment que le protocole d'association utilisé, qui

15 est un protocole non-agrégratif, permet d'obtenir des conjugués stérilisables par filtration sur membrane 0,2 μ m.

Ainsi dans un protocole de conjugaison utilisant :

20 - des biovecteurs à une concentration exprimée en NPS cationique comprise entre 1 et 20 mg/ml,

- des oligonucléotides (par exemple des oligonucléotides antisens ou des ribozymes) à une concentration comprise entre 1 et 20 mg/ml,

25 - un rapport oligonucléotide/NPS cationique compris entre 2 et 40%, et préférentiellement entre 5 et 20%,

- une cinétique d'ajout de la solution d'oligonucléotide comprise entre 5 μ l/ml/h et 300 μ l/ml/h,

- une température d'incubation comprise entre 20°C et 60°C, et préférentiellement entre 40°C et 50°C,

on obtient des conjugués de l'invention dont les caractéristiques fonctionnelles sont remarquables.

Exemple 9 : Protection des oligonucléotides après conjugaison avec les biovecteurs

Des oligonucléotides (phosphodiester, 15 mères, Genset, France) sont marqués au phosphore 32 par la méthode suivante : marquage de l'extrémité 5' avec de l'ATP-[g³²P] par la T4 polynucléotide kinase (Boehringer Mannheim, France), suivi d'une purification sur colonne d'exclusion.

Ces oligonucléotides libres ou conjugués avec des Biovecteurs (rapport Oligonucléotide/ NPS 10%) sont incubés à une concentration de 6,25 µg/ml dans 15 différents milieux :

- RPMI 1640 + 10% de Sérum de veau foetal
- RPMI 1640 + 10% de sérum de veau foetal inactivé (Contrôle négatif)
- Plasma humain

20 A différents temps, les échantillons sont prélevés, chauffés à 65°C pour détruire les activités nucléasiques, et conservés à 4°C jusqu'à l'analyse. Les échantillons sont analysés par electrophorèse sur gel acrylamide (20%). Les gels sont autoradiographiés et 25 quantifiés sur Kodak DSC 200 système.

La figure 4 montre que la conjugaison des oligonucléotides aux Biovecteurs permet d'obtenir une protection efficace contre les nucléases. En effet, les oligonucléotides libres sont rapidement dégradés dans les milieux contenant du sérum actif. Ainsi, dans ces milieux la dégradation de l'oligonucléotide libre est totale après 45 minutes d'incubation. A l'inverse après conjugaison aux biovecteurs, la dégradation complète des oligonucléotides est obtenue après 6 à 8 heures d'incubation.

Le même type de profil peut être obtenu après incubation dans du plasma humain, le temps de demie-vie passant de 120 min. à 225 min., respectivement pour l'oligonucléotide libre et conjugué aux Biovecteurs.

5

Exemple 10 : Pénétration cellulaire des conjugués oligonucléotides/Biovecteurs.

10

Protocole.

15

Des conjugués Biovecteurs/oligonucléotides sont préparés avec un Oligonucléotide marqué à la fluorescéine (phosphodiester, 18 mères, Genset, France). Les oligonucléotides, soit libres, soit conjugués aux biovecteurs sont incubés avec $2 \cdot 10^5$ cellules MCF7 (carcinome mammaire humain) à la concentration de 0.78 et 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

20

Après incubation des cellules à 37°C, celles-ci sont collectées par trypsinisation et lavées en PBS. Les cellules sont alors incubées pour 40 min. en monensine (20 μM) et analysées par cytométrie en flux possédant un laser d'excitation à 488 nm et un filtre d'émission à 530 nm (Becton Dickinson, France). Les résultats sont exprimés en unité arbitraire de fluorescence obtenue pour 10^4 cellules vivantes.

25

La figure 5 donne les résultats obtenus et montre la capacité des Biovecteurs à augmenter la pénétration cellulaire des oligonucléotides. En particulier, de façon attendue, la pénétration cellulaire des oligonucléotides est extrêmement faible. A l'inverse, une pénétration cellulaire efficace de l'oligonucléotide peut être obtenue après conjugaison au Biovecteur. Cette pénétration est liée à la concentration en conjugué oligonucléotide-Biovecteur et au temps d'incubation du conjugué et des cellules.

30

35 L'association de ces propriétés du conjugué Oligonucléotide-biovecteur, stabilisation de

l'oligonucléotide face à l'action des nucléases et pénétration cellulaire, est certainement le point important pour l'amélioration de l'activité biologique des oligonucléotides dans les stratégies antisens et 5 ribozymes.

Exemple 11 : Activité des conjugués
Antisens-Biovecteur sur lignée HL60

Des biovecteurs sont préparés selon le 10 protocole décrit à l'exemple 3 dont les NPS possèdent des caractéristiques définies (par exemple une charge de 0,8 mEq/g et un taux de réticulation de 12,5 %)..

Un antisens ciblant l'ARNm de l'oncogène c-myc (15 mères phosphorothioate, Lynx Therapeutics, 15 Californie) est conjugué à ces biovecteurs selon le protocole décrit à l'exemple 6, avec un rapport oligonucléotide/NPS de 5%.

Les Biovecteurs non conjugués, 20 l'oligonucléotide libre ou conjugué aux biovecteurs, sont incubés à 37°C avec 5 10⁵ cellules (lignée HL60) à la concentration de 1µM dans le milieu de culture (RPMI1640 + 10% de sérum de veau foetal). A différent temps, les cellules sont prélevées, lavées en PBS et la 25 prolifération cellulaire est déterminée par un test au MTT.

Les résultats rapportés à la figure 6 montrent une nette amélioration de l'activité antisens qui s'exprime par une inhibition de la prolifération cellulaire au cours du temps. Il est important de noter que 30 pour la concentration utilisée (1 µM), l'oligonucléotide libre n'est pas capable d'exprimer cette activité. A l'inverse, les conjugués oligonucléotide-biovecteurs dans les conditions permettent d'inhiber la prolifération cellulaire pendant les cinq jours de 35 l'expérience.

5 L'oligonucléotide utilisé dans ces expériences étant un oligonucléotide phosphorathioate, par nature résistant aux nucléases présentes dans le milieu de culture, cette amélioration de l'activité antisens semble bien être due, à l'augmentation de la concentration cellulaire en oligonucléotides.

Exemple 12 : Activité cellulaire des conjugués Ribozyme Biovecteur.

10 Des biovecteurs sont préparés selon le protocole décrit à l'exemple 3 dont les NPS possèdent des caractéristiques définies (par exemple une charge de 0,8 mEq/g et un taux de réticulation de 12,5 %).

15 Des ribozymes ciblant le mRNA de l'oncogène c-myb (Ribozyme Pharmaceutical Inc., Boulder, Colorado) sont conjugués à ces biovecteurs selon le protocole décrit à l'exemple 6 avec un rapport oligonucléotide/NPS de 5%. De plus, trois contrôles négatifs sont préparés dans les même conditions, un conjugué de Ribozyme 20 inactif, Ribozyme incapable de effectuer la coupure catalytique du mRNA, un conjugué de "scrambled" Ribozyme, Ribozyme incapable de reconnaître la séquence du c-myb, et des biovecteurs vides. Par comparaison à l'art antérieur, les ribozymes actifs et inactifs sont 25 conjugués à de la lipofectamine.

30 Dans ces expériences, 2.10^5 cellules RSMC (rat smooth muscle cell) sont incubées en milieu de culture sans sérum (Optimem). Après 48 heures d'incubation, 100 μ l d'Optimem contenant des concentrations variables de Ribozymes sont ajoutés aux cellules. Après une nouvelle incubation de 24 heures (3 heures pour la lipofectamine), la prolifération cellulaire est stimulée en plaçant les cellules dans un milieu de culture complémenté avec 10% de sérum de veau 35 foetal. La prolifération cellulaire est déterminée par un test au 5 Bromo deoxy Uridine (BrdU).

5 Les figures 7a et 7b montrent la courbe de réponse obtenue pour les conjugués Ribozyme-Biovecteurs, des Ribozymes-lipofectamine, ainsi que pour différents contrôles, Biovecteur vide ou conjugué avec des ribozymes inactifs. Dans les même conditions les 10 Ribozymes actifs ou inactifs non conjugués aux biovecteurs ne présentent aucune inhibition de la prolifération cellulaire. Dans les mêmes conditions, la lipofectamine présente une toxicité importante, qui d'une part ne permet pas d'accroître la concentration en ribozymes, et d'autre part rend difficile la comparaison d'activité des ribozymes actifs et inactifs.

15 Ainsi, les biovecteurs permettent d'augmenter considérablement l'activité biologique des ribozymes, de manière avantageuse par rapport à l'art antérieur.

20 Exemple 13 : Inhibition spécifique de la synthèse d'une protéine par un antisens conjugué aux biovecteurs.

Des biovecteurs sont préparés selon le protocole décrit à l'exemple 4 dont les NPS possèdent des caractéristiques définies (par exemple une charge de 1,6 mEq/g et un taux de réticulation de 10 %)..

25 Deux conjugués d'oligonucléotide-biovecteurs sont préparés à partir d'un antisens phosphorothioate ciblant le mRNA du pro-oncogène Erb2 (15 mères, Genset, France) et de la même séquence antisens phosphodiester (15 mères, Genset, France). Parallèlement, les conjugués 30 témoins, "scrambled" séquence conjuguée aux Biovecteurs, et Biovecteur vides, ont été préparés. Ces différents conjugués sont préparés selon le protocole décrit à l'exemple 6 avec un rapport oligonucléotide/NPS de 10%. Par comparaison, les mêmes antisens sont conjugués à du 35 DOTAP.

Dans ces expériences, 7.10^4 cellules SK-Br3 (lignée d'un adénocarcinome humain qui sur-exprime la protéine P185-Erb2) dans 300 μ l de RPMI 1640 (Gilco, France) sont incubées en présence des différentes préparations : conjugué oligonucléotide Biovecteur, oligonucléotide libre ou Biovecteur libre. Les incubations sont effectuées à la concentration de 180 μ g/ml de Biovecteur correspondant à une concentration de 3 μ M en oligonucléotide. Après 5 heures d'incubation, 1 ml de RPMI 1640 complémenté avec 5% de sérum de veau foetal est ajouté aux suspensions cellulaires et les cellules sont de nouveau incubées à 37°C.

Après 72 heures d'incubation, les cellules sont testées pour la présence de la protéine P185-Erb2. Pour ce test, les cellules sont collectées, lavées en PBS et incubées en présence d'un anticorps anti Erb-2 (OP39, Oncogene Science, France). L'analyse des cellules est réalisée au cytomètre en flux après révélation par un deuxième anticorps marqué à la fluorescéine.

Les résultats obtenus et présentés à la figure 8 montrent l'apport de la conjugaison aux biovecteurs dans l'expression de l'activité biologique d'un antisens. Il est particulièrement notable qu'il n'existe pas de différence significative entre l'activité des antisens phosphodiester et phophorothioate. Cette absence de différence est certainement l'expression de la protection de l'oligonucléotide après conjugaison aux Biovecteurs. D'autre part, les antisens sont deux fois plus actifs après conjugaison aux Biovecteurs qu'après conjugaison aux lipides cationiques classiquement utilisés (DOTAP).

Exemple 14 : Activité biologique in-vitro d'un antisens conjugué aux biovecteurs (Modèle Erb-2).

Des conjugués oligonucléotides-biovecteurs sont préparés dans les conditions décrites à l'exemple

13 et en utilisant le dérivé phosphorothioate de cet exemple.

5 Pour ces expériences de prolifération, 5×10^3 cellules SK-Br3 dans 60 μ l de RPMI 1640 (Gilco, France) sont incubées en présence des différentes préparations, conjugué d'oligonucléotide phosphorothioate et de biovecteur, d'oligonucléotide phosphorothioate libre ou biovecteur libre. Les incubations sont effectuées à la concentration de 10 180 μ g/ml de biovecteur correspondant à une concentration de 3 μ M en oligonucléotide. Après 5 heures d'incubation, 200 μ l de RPMI 1640 complémenté avec 5% de sérum de veau foetal sont ajoutés aux suspensions cellulaires et les cellules sont de nouveau incubées à 37°C.

15 A différents temps, 24, 48, 72, 96 et 120 heures, les cellules sont collectées par trypsinisation et comptées sur un compteurs de cellules (Coultronics, France). Les résultats sont la moyenne de six points expérimentaux.

20 La figure 9 montre la courbe de prolifération des cellules après traitement avec les différentes préparations. Dans ces conditions, l'oligonucléotide libre est incapable d'inhiber la prolifération cellulaire. Il est notable que 25 l'oligonucléotide ciblant un oncogène permette, après conjugaison aux biovecteurs, d'inhiber complètement la prolifération cellulaire de cette lignée tumorale.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1) Uhlmann, E., & Peyman, A. (1990) *Chem. Rev.*, 90, 543-583.
- 5 2) Wagner, R. W (1994) *Nature*, 372, 333-335.
- 3) Stein, C. A., & Cohen, J.S. (1988) *Cancer Res.*, 48, 2659-2668.
- 10 4) Hélène, C., & Toulmé, J.J. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, 1049, 99-125.
- 5) Thuong, N. T., & Hélène, C. (1993) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 32, 666-690.
- 15 6) Pantopoulos, K., Johansson, H. E., & Hentze, M. W. (1994) *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.*, 48, 181-238.
- 7) Stein, C. A., & Cheng, Y.-C. (1993) *Science*, 261, 14004-1012.
- 18 8) Gura, T. (1995) *Science*, 270, 575-577.
- 9) Woolf, T. D. (1995) *Antisense Res. Dev.*, 5, 227-232.
- 20 10) Miller, P. S. (1996) *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.*, 52, 261-291.
- 11) Melton, D. A. (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 144-148.
- 25 12) Maher, J., & Dolnick, B. J. (1988) *Nucleic Acids Res.*, 16, 3341-3358.
- 13) Liebhhaber, S. A., Cash, F., Eshleman, S. S. (1992) *J. Mol. Biol.*, 226, 609-621.
- 28 14) Johansson, H. E., Belsham, G.J., Sproat, B. S., & Hentze M. W. (1994) *Nucleic Acids Res.*, 22, 4591-4598.
- 30 15) Bonham, M. A., Brown, S., Boyd, A. L., Brown, P. H., Bruckenstein, D. A., Hanvey, J. C., Thomson, S. A., Pipe, A., Hassman, F., Bisi, J. E., Froehler, B. C., Matteucci, M. D., Wagner, R. W., Noble, S. A., & Babiss, L. E. (1995) *Nucleic Acids Res.*, 23, 1197-1203.

16) Hélène, C and Toulmé, J .J. (1990)
Biochim. Biophys. Acta 1049, 99-125.

17) Stein C. A. and Cheng, Y. C. (1993)
Science 261, 1004-1012.

5 18) Stein C. A. and Cheng, Y. C. (1988)
Cancer Res. 48, 2659-68.

19) Simons M., Edelman, E. R., DeKeyser, J. L., Langer, R. and Rosenberg, R. D. (1992) *Nature* 359, 67-70.

10 20) Whitesell, L. Geselowitz, D., Chavany, C., Fahmi, B., Walbridge, S., Alger, J. R. and Neckers, L. M. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4665-4669.

21) Stein, C.A. and Krieg, A.M. (1994)
Antisense Res. Dev. 4, 67-69.

15 22) Stein, C.A. (1995) *Nature Medicine* 1, 1119-1121.

23) Vlassov, V.V., Balakireva, L.A. and Yakubov, L.A. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1197, 95-108.

20 24) Léonetti, J.P., Degols, G., Clarenc, J.P., Mechti, N. and Lebleu, B. (1993) *Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.* 44, 143-66.

25 25) Wagner, R.W. (1994) *Nature* 372, 333-335.

26) Uhlmann, E. and Peyman, A. (1990) *Chem. Rev.* 90, 544-584.

27) Clarenc, J.P., Degols, G., Léonetti, J.P., Milhaud, P. and Lebleu, B. (1993) *Anticancer Drug Res.* 8, 81-94.

30 28) Cazenave, C., Stein, C.A., Loreau, N., Thuong, N.T., Neckers, L.M., Subasinghe, C. Hélène, C., Cohen, J.S. and Toulmé, J.J. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17, 4255-4273.

29) Iversen, P.L., Mata, J., Tracewell, W.G. and Zon, G. (1994) *Antisense Res. Dev.* 4, 43-52.

30) Srinivasan, S.K. and Iversen, P. (1995) J. Clin. Lab. Anal. 9, 129-137.

31) Bayever, E. and Iversen, P. (1995) J. Clin. Lab. Anal. 9, 129-137.

5 32) Watson, P.H., Pon, R.T. and Shiu, R.P. (1992) Exp. Cell Res. 202, 391-7.

33) Storey, A., Oates, D., Banks, L., Crawford, L. and Crook, T. (1991) Nucleic Acids Res. 19, 4109-4114.

10 34) Thierry, A.R. and Dritschilo, A. (1992) Nucleic Acids Res. 20, 5691-8.

35) Zelphati, O., Imbach, J.L., Signoret, N., Zon, G., Rayner, B. and Leserman, L. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 4307-4314.

15 36) Ropert, C., Lavignon, M., Dubernet, C., Couvreur, P. and Malvy, C. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 183, 879-885.

37) Léonetti, J.P., Machy, P.; Degols, G., Lebleu, B. and Leserman, L. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2448-2451.

20 38) De Smidt, P., Le Doan, T., De Falco, S. and Van Berkel, T. (1991) Nucleic Acids Res. 19, 4695-700.

39) Krieg, A.M., Tonkinson, J., Matson, S., Zhao, Q., Saxon, M., Zhang, L.M., Bhanja, U., Yakubov, L. and Stein, C.A. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1048-1052.

40) Dean, N.M. and McKay, R. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 11762-11766.

30 41) Capaccioli, S., Dipasquale, G., Mini, E., Mazzei, T. and Quattrone, A. (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 197, 818-825.

42) Yeoman, L.C., Danels, Y.J. and Lynch, M.J. (1992) *Antisense Res. Dev.* 2, 51-59.

43) Saijo, Y., Perlaky, L., Wang, H.M. and Busch, H. (1994) *Oncol. Res.* 6, 243-249.

5 44) Chavany, C. Saison-Behmoaras, T., Ledoan, T., Puisieux, F., Couvreur, P. and Hélène, C. (1994) *Pharm. Res.* 11, 1370-1378.

10 45) Schwab, G., Chavany, C., Duroux, I., Goubin, G., Lebeau, J., Hélène, C. and Saison-Behmoaras, T. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 10460-10464.

REVENDICATIONS

5 1) Conjugué ionique, stable dans un milieu biologique, d'un vecteur particulaire comprenant au moins un noyau hydrophile non liquide cationique et d'oligonucléotides polyanioniques.

10 2) Conjugué selon la revendication 1, caractérisé en ce que le vecteur particulaire comprend au moins un noyau hydrophile non liquide constitué d'une matrice de polysaccharides ou d'oligosaccharides naturellement ou chimiquement réticulés dont le taux de réticulation est sensiblement celui obtenu par réticulation avec entre 5 et 20% de mole 15 d'épichlorhydrine par mole d'ose dans les polysaccharides ou oligosaccharides.

20 3) Conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le vecteur particulaire comprend au moins un noyau hydrophile non liquide constitué d'une matrice de polysaccharides ou d'oligosaccharides naturellement ou chimiquement réticulés et modifiés par des ligands cationiques, dont le taux de charges positives est compris entre 0,6 à 25 1,8 milliEquivalent de charges positives par gramme de noyau.

30 4) Conjugué d'un vecteur particulaire et d'oligonucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le vecteur particulaire comprend au moins un noyau hydrophile non liquide constitué d'une matrice de polysaccharides ou d'oligosaccharides naturellement ou chimiquement réticulés et modifiés par des ligands cationiques, dont 35 le taux de charges positives est compris entre 0,6 à 1,8 milliEquivalent de charges positives par gramme de noyau

et le taux de réticulation est sensiblement celui obtenu par réticulation avec entre 5 et 20% de mole d'épichlorhydrine par mole d'ose dans les polysaccharides ou oligosaccharides, et en ce que ledit vecteur particulaire est conjugué par des liaisons ioniques stables en milieu biologique à des oligonucléotides polyanionique protégés par ledit vecteur particulaire, lesdits oligonucléotides polyanioniques étant capables de s'hybrider à un ARNm cellulaire.

5 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700 9705 9710 9715 9720 9725 9730 9735 9740 9745 9750 9755 9760 9765 9770 9775 9780 9785 9790 9795 9800 9805 9810 9815 9820 9825 9830 9835 9840 9845 9850 9855 9860 9865 9870 9875 9880 9885 9890 9895 9900 9905 9910 9915 9920 9925 9930 9935 9940 9945 9950 9955 9960 9965 9970 9975 9980 9985 9990 9995 9999 10000 10005 10010 10015 10020 10025 10030 10035 10040 10045 10050 10055 10060 10065 10070 10075 10080 10085 10090 10095 10099 10100 10101 10102 10103 10104 10105 10106 10107 10108 10109 10110 10111 10112 10113 10114 10115 10116 10117 10118 10119 10120 10121 10122 10123 10124 10125 10126 10127 10128 10129 10130 10131 10132 10133 10134 10135 10136 10137 10138 10139 10140 10141 10142 10143 10144 10145 10146 10147 10148 10149 10150 10151 10152 10153 10154 10155 10156 10157 10158 10159 10160 10161 10162 10163 10164 10165 10166 10167 10168 10169 10170 10171 10172 10173 10174 10175 10176 10177 10178 10179 10180 10181 10182 10183 10184 10185 10186 10187 10188 10189 10190 10191 10192 10193 10194 10195 10196 10197 10198 10199 10200 10201 10202 10203 10204 10205 10206 10207 10208 10209 10210 10211 10212 10213 10214 10215 10216 10217 10218 10219 10220 10221 10222 10223 10224 10225 10226 10227 10228 10229 10230 10231 10232 10233 10234 10235 10236 10237 10238 10239 10240 10241 10242 10243 10244 10245 10246 10247 10248 10249 10250 10251 10252 10253 10254 10255 10256 10257 10258 10259 10260 10261 10262 10263 10264 10265 10266 10267 10268 10269 10270 10271 10272 10273 10274 10275 10276 10277 10278 10279 10280 10281 10282 10283 10284 10285 10286 10287 10288 10289 10290 10291 10292 10293 10294 10295 1029

9) Conjugué selon les revendications 7 ou 8, caractérisé en ce que le noyau hydrophile non liquide est recouvert en totalité ou en partie d'une couche externe constituée essentiellement de phospholipides 5 naturels ou synthétiques et/ou de céramides, éventuellement associés à d'autres composés amphiphiles.

10) Conjugué selon les revendications 7 ou 8, caractérisé en ce que le noyau hydrophile non liquide est recouvert en totalité ou en partie d'une couche externe constituée d'acides gras naturels fixés au noyau 10 par des liaisons covalentes.

15) Conjugué selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le noyau hydrophile non liquide est recouvert en totalité ou en partie de deux couches de composés amphiphiles.

20) Conjugué selon la revendication 11, caractérisé en ce que le noyau hydrophile non liquide est couvert en totalité ou en partie d'une première couche d'acides gras, elle-même recouverte en totalité ou en partie d'un couche lipidique.

25) Conjugué selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend, associé au noyau et/ou à une couche externe, un principe actif utile pour le transport, l'adressage ou la présentation du conjugué au niveau de la membrane 30 de la cellule et/ou dans le cytoplasme de celle-ci.

35) Conjugué selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les oligonucléotides sont des oligodésoxyribonucléotides ou des oligoribonucléotides, antisens ou ribozymes, éventuellement marqués, naturels ou modifiés dès lors

que le marquage ou la modification ne change pas substantiellement leur caractère polyanionique.

5 15) Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend un ou plusieurs conjugués selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 ou un sel pharmaceutiquement acceptable dudit conjugué, dispersé dans des excipients pharmaceutiquement acceptables.

10 16) Conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 ou composition selon la revendication 15, destiné à être utilisé pour adresser un oligonucléotide dans une cellule.

15 17) Vecteur particulaire comprenant au moins un noyau hydrophile non liquide cationique constitué d'une matrice de polysaccharides ou d'oligosaccharides naturellement ou chimiquement réticulés portant une charge globale cationique, présentant au moins une des 20 caractéristiques suivantes :

25 - le taux de réticulation est sensiblement celui obtenu par réticulation avec entre 5 et 20% de mole d'épichlorhydrine par mole d'ose dans les polysaccharides ou oligosaccharides;

25 - ladite matrice de polysaccharides ou d'oligosaccharides naturellement ou chimiquement réticulés est modifiée par des ligands cationiques, dont le taux de charges positives est compris entre 0,6 à 1,8 milliEquivalents et avantageusement entre 0,8 et 1,6 30 milliEquivalent de charges positives par gramme de noyau.

35 18) Vecteur particulaire selon la revendication 17, caractérisé en ce que les polysaccharides de la matrice sont choisis dans le groupe comprenant le dextrane, l'amidon, la cellulose,

leurs dérivés et substitués, leurs produits d'hydrolyse et leurs sels et esters.

5 19) Vecteur particulaire selon l'une des revendications 17 ou 18, caractérisé en ce que le noyau hydrophile non liquide est recouvert en totalité ou en partie d'au moins une couche de composés amphiphiles.

10 20) Vecteur particulaire selon la revendication 19, caractérisé en ce que les composés amphiphiles sont choisis parmi les lipides et phospholipides naturels ou synthétiques, les céramides, les acides gras, les glycolipides, les lipoprotéines et les tensioactifs.

15

20 21) Vecteur particulaire selon les revendications 19 ou 20, caractérisé en ce que le noyau hydrophile non liquide est recouvert en totalité ou en partie d'une couche externe constituée essentiellement de phospholipides naturels ou synthétiques et/ou de céramides, éventuellement associés à d'autres composés amphiphiles.

25 22) Vecteur particulaire selon les revendications 20 ou 21, caractérisé en ce que le noyau hydrophile non liquide est recouvert en totalité ou en partie d'une couche constituée d'acides gras naturels fixés au noyau par des liaisons covalentes.

30 23) Vecteur particulaire selon la revendication 22, caractérisé en ce que la couche d'acides gras est elle-même recouverte en totalité ou partie d'une couche lipidique.

35 24) Utilisation d'un vecteur particulaire comprenant au moins un noyau hydrophile non liquide

cationique, pour adresser un oligonucléotide dans une cellule.

25) Utilisation selon la revendication 24,
5 dans laquelle le vecteur particulaire est un vecteur
selon l'une quelconque des revendications 17 à 23.

26) Utilisation selon l'une des
10 revendications 24 ou 25, caractérisé en ce que les
oligonucléotides sont des oligodésoxyribonucléotides ou
des oligoribonucléotidesribozymes, antisens ou
ribozymes, éventuellement marqués, naturels ou modifiés
dès lors que le marquage ou la modification ne change
pas substantiellement leur caractère polyanionique.

15

27) Procédé de préparation d'un conjugué
ionique, stable dans un milieu biologique, d'un vecteur
particulaire comprenant au moins un noyau hydrophile non
liquide cationique et de séquences courtes d'acide
20 nucléique polyanioniques, caractérisé en ce qu'il
comprend les étapes suivantes :

25

a) la préparation du noyau cationique :

- en mélangeant un polymère hydrophile, de
nature polysaccharidique ou oligosaccharidique,
chimiquement ou naturellement réticulé avec un agent de
réticulation dans un rapport compris entre 0,06 et 0,2
mole, et de préférence entre 0,1 et 0,15 mole, d'agent
de réticulation par unité d'ose dans le polysaccharide
ou l'oligosaccharide,

30

- en ajoutant au mélange ci-dessus un ligand
cationique de façon à obtenir un taux de charge du noyau
compris entre 0,6 et 1,8 et de préférence entre 0,8 et
1,6 millEquivalent par grammé de noyau;

35

b) le chargement des oligonucléotides
 polyanioniques :

5 - en ajoutant, sous agitation, au noyau préparé à l'étape (a), entre environ 0,02 et 0,4 gramme, et de préférence entre 0,05 et 0,2 gramme, d'oligonucléotide par gramme de noyau, selon un débit compris entre environ 0,25 µg d'oligonucléotide par mg de noyau et par heure et 6mg par mg de noyau et par heure, et de préférence entre 4µg/mg/heure et 1 mg/mg/heure, à une température comprise entre environ 20°C et 60°C et de préférence entre 40°C et 50°C.

10

28) Procédé selon la revendication 27, caractérisé en ce que avant l'étape (b), on greffe sur la totalité ou sur une partie du noyau préparé à l'étape (a) une couche constituée de composés amphiphiles.

15

29) Procédé selon la revendication 28, caractérisé en ce que l'on greffe sur la totalité ou une partie de la première couche recouvrant le noyau une seconde couche constituée de composés amphiphiles.

20

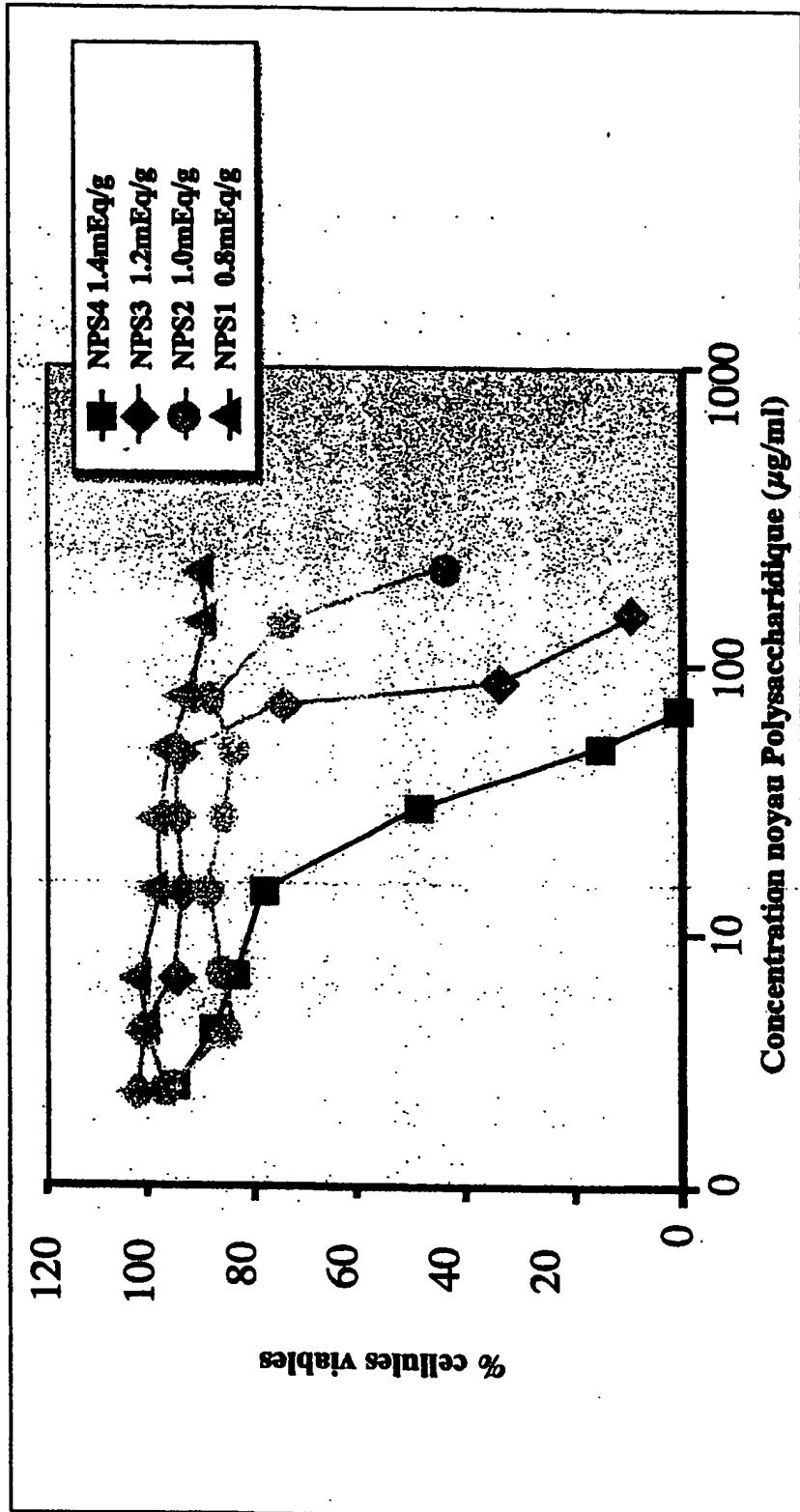
30) Procédé selon l'une quelconque des revendications 27 à 29, caractérisé en ce que l'étape (b) consiste à ajouter à des vecteurs particulaires préparés conformément à l'étape (a) avec ou sans couche(s) externes de composés amphiphiles, dont la concentration exprimée en noyau cationique est comprise entre 1 et 20 mg/ml, une solution d'oligonucléotides à une concentration comprise entre 1 et 20 mg/ml, de façon à obtenir un rapport oligonucléotides/vecteurs particulaires compris entre 2 et 40%, et de préférence entre 5 et 20%, selon une cinétique d'ajout de la solution d'oligonucléotide comprise entre 5 µl/ml/h et 300 µl/ml/h, et à une température d'incubation comprise entre 20°C et 60°C, et préférentiellement entre 40°C et 50°C,

30

35

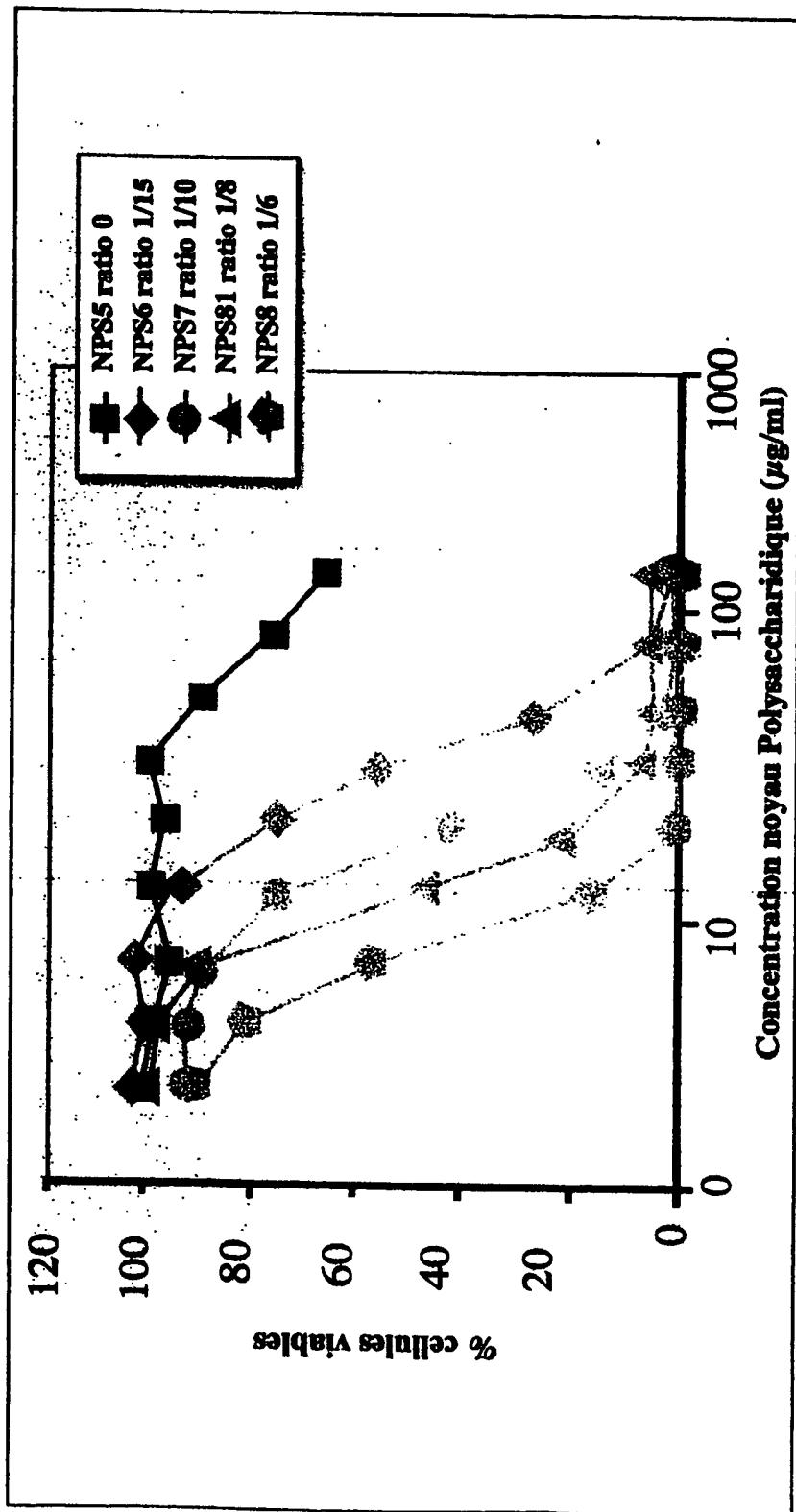
Effet charge ionique

Fig. 1



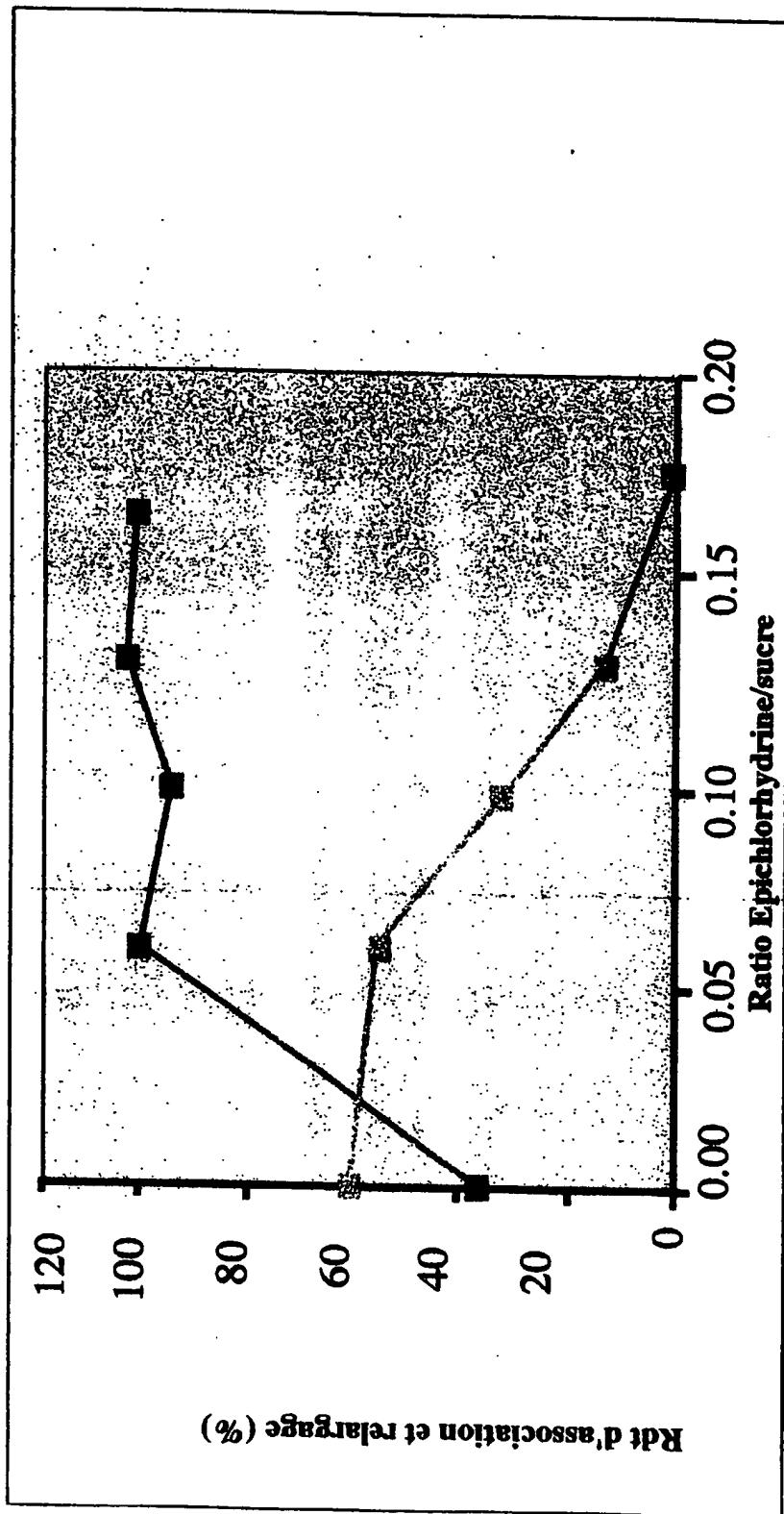
Effet taux réticulation

Fig.2



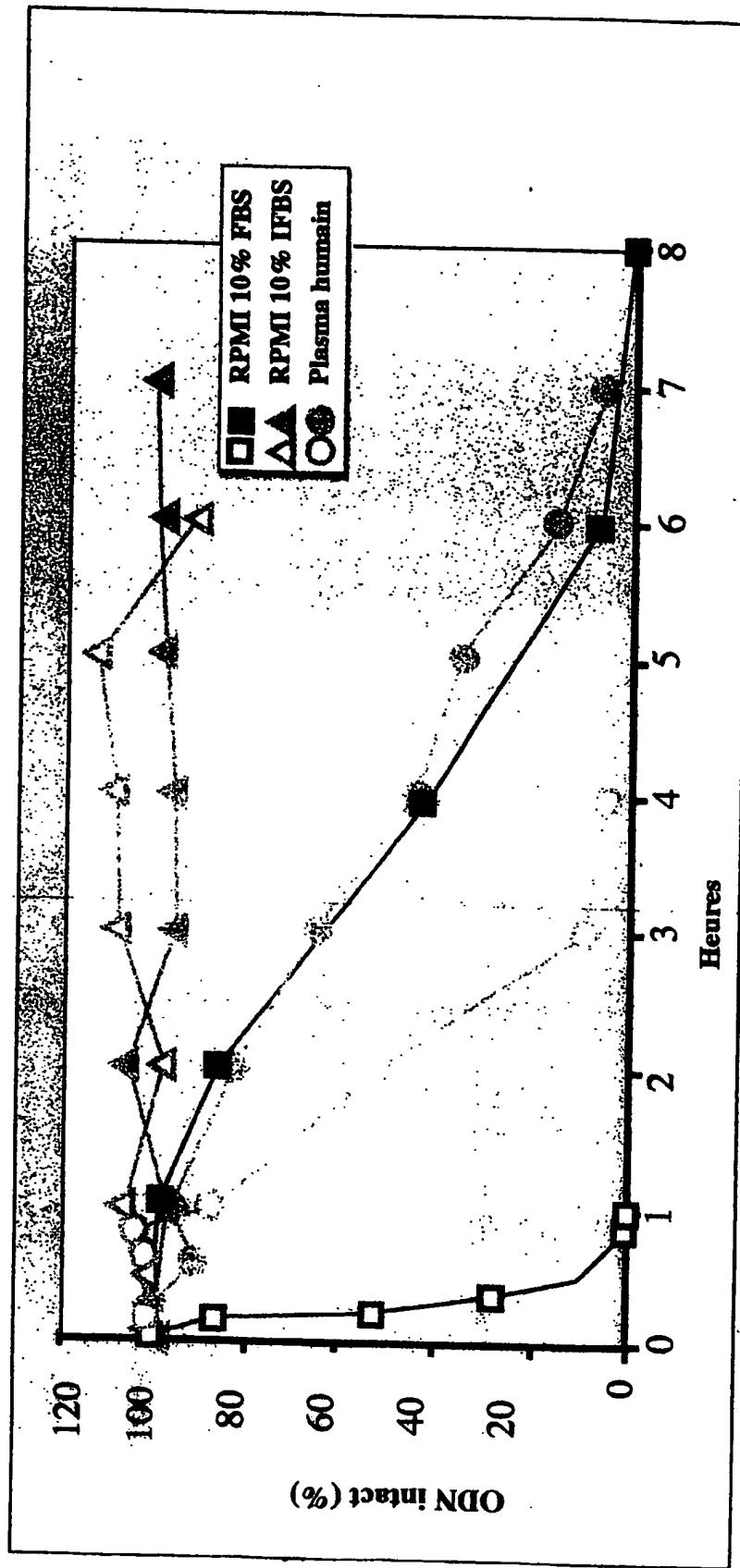
Effet de taux de réticulation sur le chargement

Fig. 3



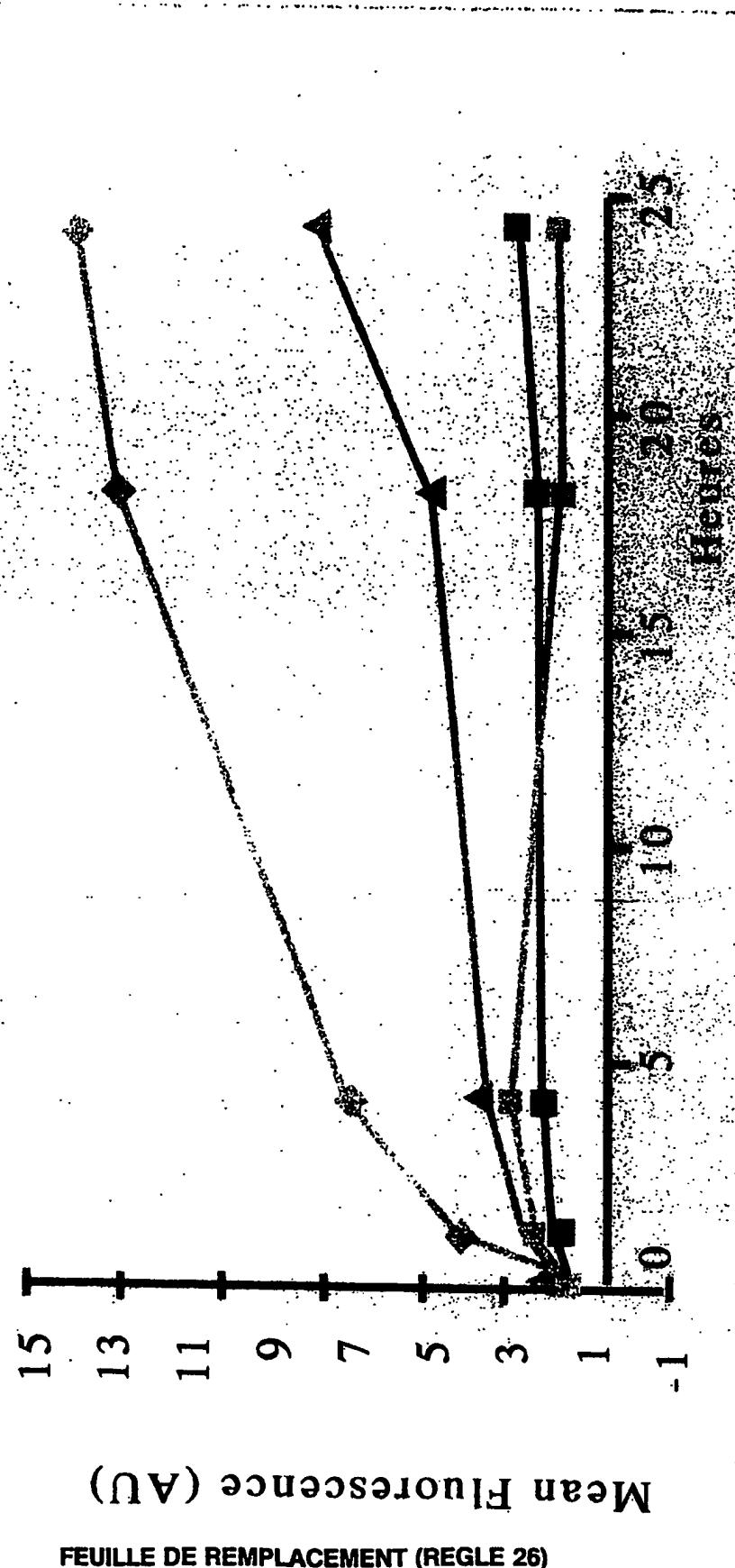
Protection de l'ODN

Fig. 4



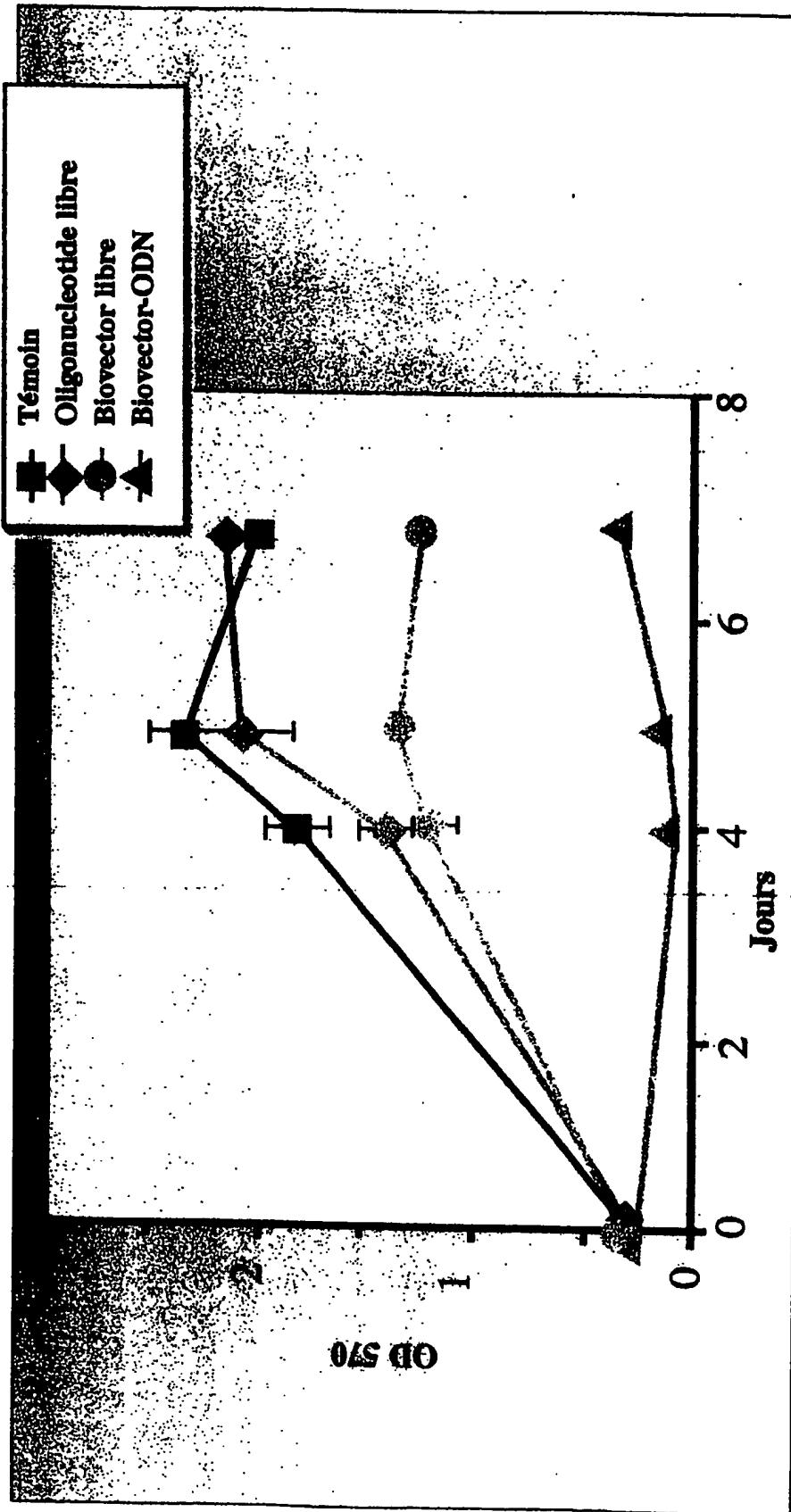
ODN Cellular uptake

Fig.5



Comparaison ODN-Biovector et ODN libre

Fig. 6



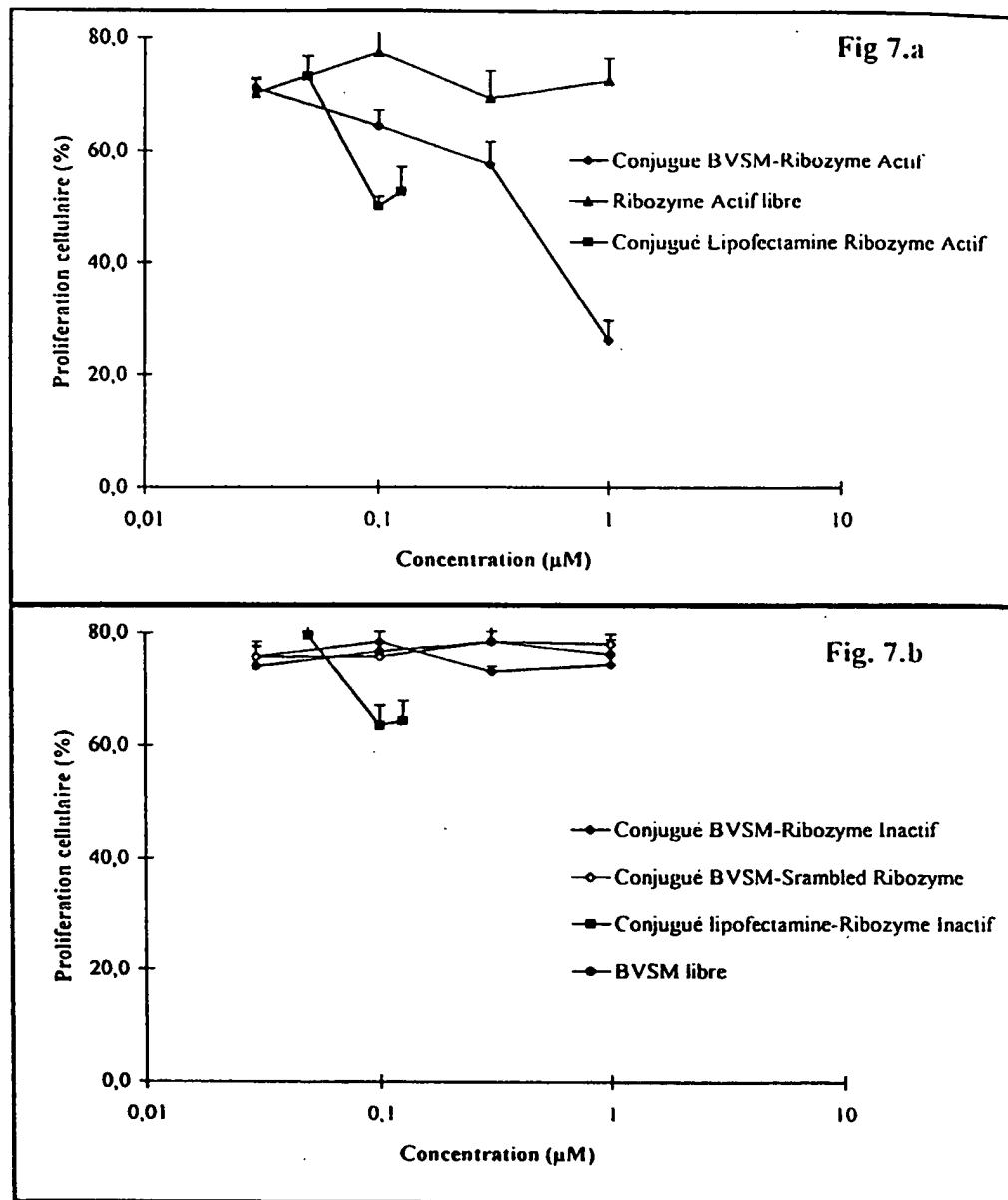
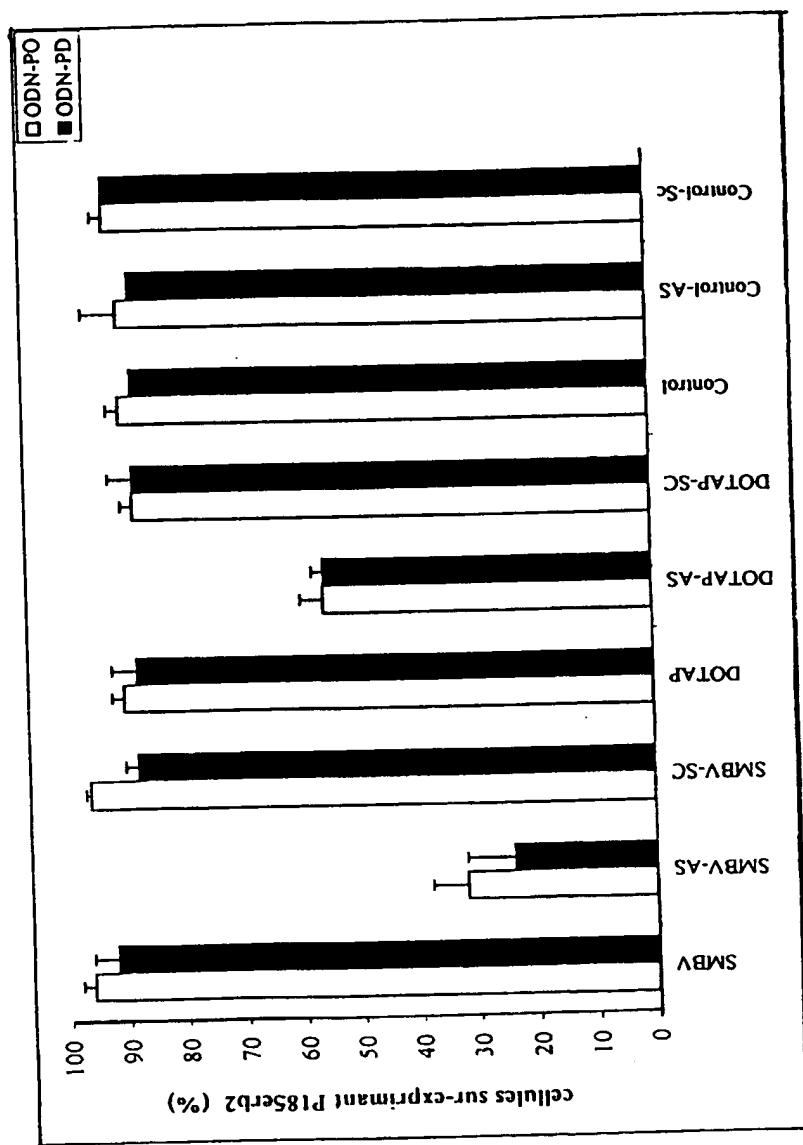
Activité cellulaire des conjugués Ribozyme Biovecteur

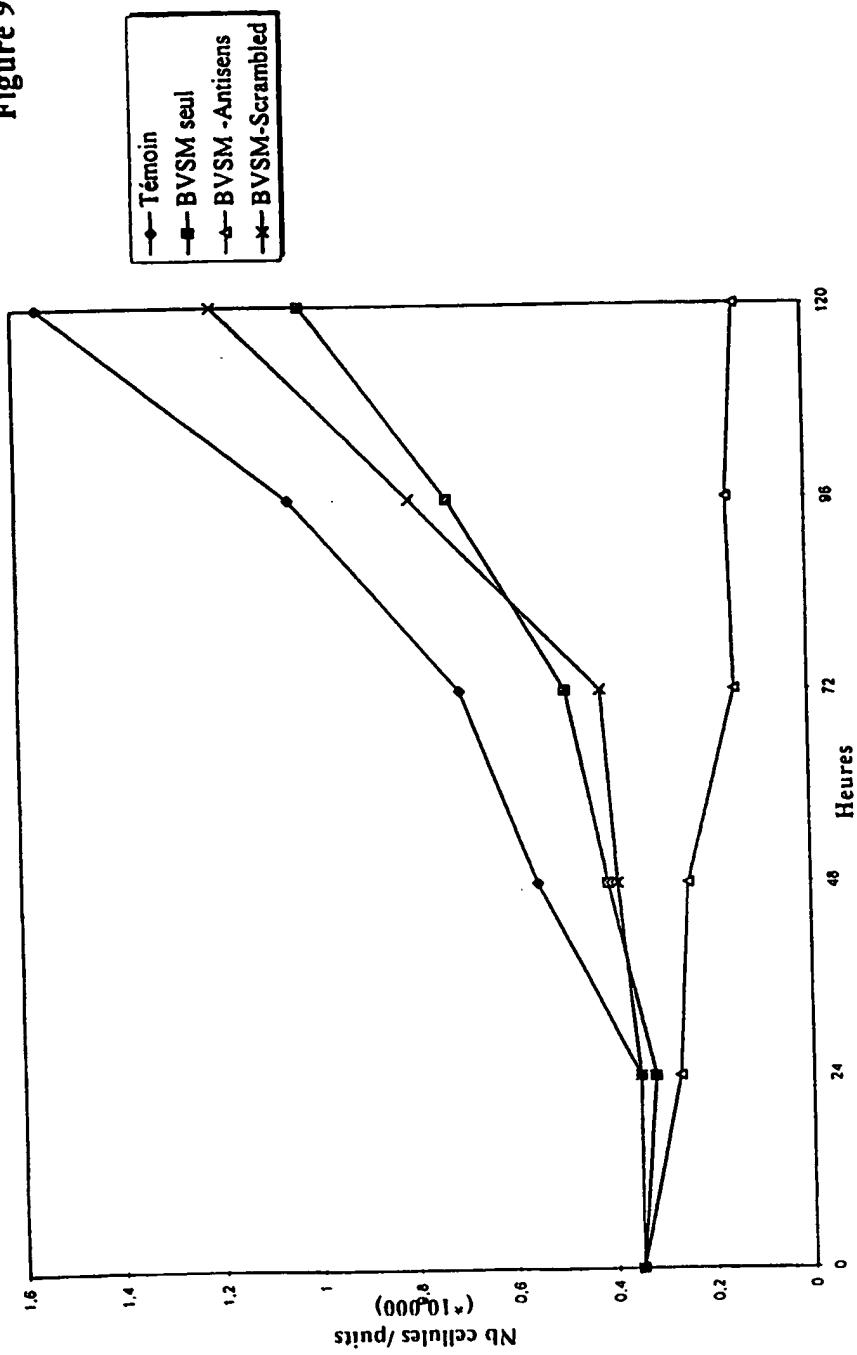
Figure 8

Effet de conjugué ODN-Biovecteur sur l'expression protéique



Activité cellulaire de conjugués ODN antisens-Biovecteur

Figure 9



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No
PCT/FR 97/02332

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C12N15/88 C12N15/10 A61K9/51 C12N15/11 C12N9/00
 A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	M. BERTON ET AL: "Delivery of oligonucleotides by synthetic low density lipoproteins : incorporation and stability studies" PROCEEDINGS OF THE 21ST INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CONTROLLED RELEASE OF BIOACTIVE MATERIALS, vol. 21, 27 - 30 June 1994, NICE , FRANCE, pages 83-84, XP002042293 cited in the application A see the whole document ---	1,24
A		2-23, 25-30

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

2

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
9 April 1998	23. 04. 1998
Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Le Cornec, N

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte	nal Application No
PCT/FR 97/02332	

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	M. PEYROT: "Les biovecteurs supramoléculaires, une nouvelle génération de transporteurs de principes actifs" S.T.P. PHARMA PRATIQUES , vol. 4, no. 5, June 1994, pages 344-346, XP002042294 see the whole document ---	1-30
Y	WO 92 21329 A (A ET S BIOVECTORS) 10 December 1992 cited in the application see claims; examples 14,19-21 ---	1-30
Y	MIGUEL DE I ET AL: "SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF SUPRAMOLECULAR BIOVECTOR(SMBV) SPECIFICALLY DESIGNED FOR THE ENTRAPMENT OF IONIC MOLECULES" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1237, no. 1, 1995, pages 49-58, XP000601223 *see the whole document in particular page 55 right hand column and page 57 left hand column*	1-30
Y	WO 92 21330 A (A ET S BIOVECTEURS) 10 December 1992 cited in the application see page 8, line 21 - line 26; claims; example 6 see page 3, line 20 - line 25 ---	1-30
Y	A.R. THIERRY ET AL: "Liposomal Delivery as a new approach to transport antisense oligonucleotides" GENE REGULATION . BIOLOGY OF ANTISENSE RNA AND DNA , vol. 1, 1992, ROBERT P. ERICKSON AND JONATHAN G. IZANT . RAVEN PRESS, NEW YORK, USA, pages 147-161, XP002040368 *see the whole document in particular pages 149-150*	1-30
Y	WO 94 20078 A (A ET S BIOVECTEURS) 15 September 1994 cited in the application see claims; examples 2,5 ---	1-30
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/FR 97/02332

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	M. PEYROT ET AL: "Supramolecular biovectors (SMBV): a new family of nanoparticulate drug delivery systems. Synthesis and structural characterization" INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, vol. 102, 1994, pages 25-33, XP002042295 see page 31 see page 26; figure 1 ---	1-30
Y	C. CHAVANY ET AL: "Adsorption of oligonucleotides onto polyisohexylcyanoacrylate nanoparticles protects them against nucleases and increases their cellular uptake" PHARMACEUTICAL RESEARCH, vol. 11, no. 9, 1994, pages 1370-1378, XP002042296 cited in the application see the whole document ---	1-30
Y	EP 0 344 040 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)) 29 November 1989 cited in the application see page 5, line 46 - line 55; example 1 see page 5, line 5 - line 37 ---	1-30
P,X	M. BERTON ET AL: "Improved oligonucleotide uptake and stability by a new drug carrier, the SupraMolecular BioVector (SMBV)" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1355, 10 January 1997, pages 7-19, XP002042297 see the whole document in particular page 9, page 11 right-hand paragraph and page 16 last paragraph ---	1-30
T	S.P. VYAS ET AL: "Self-assembling supramolecular biovectors: a new dimension in novel drug delivery systems" PHARMAZIE, vol. 52, no. 4, April 1997, pages 259-267, XP002042298 -----	
2		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 97/02332

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

see supplementary sheet **CONTINUATION OF INFORMATION PCT/ISA/210**

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 97/02332

Observation: Although claims 24-26 (insofar as an in vivo method is concerned) concern a method for the treatment of the human/animal body (PCT Rule 13.1(IV)), the search was carried out on the basis of the effects attributed to the product/composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/02332

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9221329 A	10-12-92	FR 2677249 A		11-12-92
		AT 152619 T		15-05-97
		CA 2088759 A		05-12-92
		DE 69219561 D		12-06-97
		DE 69219561 T		13-11-97
		EP 0542969 A		26-05-93
		JP 6500570 T		20-01-94
-----	-----	-----	-----	-----
WO 9221330 A	10-12-92	FR 2677272 A		11-12-92
		AT 145822 T		15-12-96
		CA 2088910 A		06-12-92
		DE 69215652 D		16-01-97
		EP 0547191 A		23-06-93
		JP 6500795 T		27-01-94
-----	-----	-----	-----	-----
WO 9420078 A	15-09-94	FR 2702160 A		09-09-94
		AT 158179 T		15-10-97
		CA 2157384 A		15-09-94
		DE 69405718 D		23-10-97
		DE 69405718 T		19-03-98
		EP 0687173 A		20-12-95
		EP 0782851 A		09-07-97
		EP 0787479 A		06-08-97
		JP 8507765 T		20-08-96
-----	-----	-----	-----	-----
EP 344040 A	29-11-89	FR 2631826 A		01-12-89
		ES 2054048 T		01-08-94
		WO 8911271 A		30-11-89
		JP 4500662 T		06-02-92
		US 5151264 A		29-09-92
-----	-----	-----	-----	-----

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem	Internationale No
PCT/FR 97/02332	

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C12N15/88 C12N15/10 A61K9/51 C12N15/11 C12N9/00 A61K47/48					
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB					
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C12N A61K					
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche					
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)					
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS					
Catégorie * Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents				no. des revendications visées	
X	M. BERTON ET AL: "Delivery of oligonucleotides by synthetic low density lipoproteins : incorporation and stability studies" PROCEEDINGS OF THE 21ST INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CONTROLLED RELEASE OF BIOACTIVE MATERIALS, vol. 21, 27 - 30 juin 1994, NICE , FRANCE, pages 83-84, XP002042293 cité dans la demande			1,24	
				2-23, 25-30	
A	voir le document en entier --- -/- 				
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents			<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "J" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "8" document qui fait partie de la même famille de brevets					
2	Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 9 avril 1998	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 23. 04. 1998			
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patenttaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016			Fonctionnaire autorisé Le Cornec, N		

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No
PCT/FR 97/02332

C(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	M. PEYROT: "Les biovecteurs supramoléculaires, une nouvelle génération de transporteurs de principes actifs" S.T.P. PHARMA PRATIQUES , vol. 4, no. 5, juin 1994, pages 344-346, XP002042294 voir le document en entier ---	1-30
Y	WO 92 21329 A (A ET S BIOVECTORS) 10 décembre 1992 cité dans la demande voir revendications; exemples 14,19-21 ---	1-30
Y	MIGUEL DE I ET AL: "SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF SUPRAMOLECULAR BIOVECTOR(SMBV) SPECIFICALLY DESIGNED FOR THE ENTRAPMENT OF IONIC MOLECULES" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1237, no. 1, 1995, pages 49-58, XP000601223 * le document en entier plus particulièrement page 55 colonne de droite et page 57 colonne de gauche *	1-30
Y	WO 92 21330 A (A ET S BIOVECTEURS) 10 décembre 1992 cité dans la demande voir page 8, ligne 21 - ligne 26; revendications; exemple 6 voir page 3, ligne 20 - ligne 25 ---	1-30
Y	A.R. THIERRY ET AL: "Liposomal Delivery as a new approach to transport antisense oligonucleotides" GENE REGULATION . BIOLOGY OF ANTISENSE RNA AND DNA , vol. 1, 1992, ROBERT P. ERICKSON AND JONATHAN G. IZANT .RAVEN PRESS, NEW YORK, USA, pages 147-161, XP002040368 * le document en entier plus particulièrement page 149-150 *	1-30
Y	WO 94 20078 A (A ET S BIOVECTEURS) 15 septembre 1994 cité dans la demande voir revendications; exemples 2,5 ---	1-30
		-/-

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 97/02332

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	M. PEYROT ET AL: "Supramolecular biovectors (SMBV): a new family of nanoparticulate drug delivery systems. Synthesis and structural characterization" INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, vol. 102, 1994, pages 25-33, XP002042295 voir page 31 voir page 26; figure 1 ---	1-30
Y	C. CHAVANY ET AL: "Adsorption of oligonucleotides onto polyisohexylcyanoacrylate nanoparticles protects them against nucleases and increases their cellular uptake" PHARMACEUTICAL RESEARCH, vol. 11, no. 9, 1994, pages 1370-1378, XP002042296 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-30
Y	EP 0 344 040 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)) 29 novembre 1989 cité dans la demande voir page 5, ligne 46 - ligne 55; exemple 1 voir page 5, ligne 5 - ligne 37 ---	1-30
P,X	M. BERTON ET AL: "Improved oligonucleotide uptake and stability by a new drug carrier, the SupraMolecular BioVector (SMBV)" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1355, 10 janvier 1997, pages 7-19, XP002042297 voir le document en entier plus particulièrement page 9, page 11 paragraphe de droite et page 16 dernier paragraphe ---	1-30
T	S.P. VYAS ET AL: "Self-assembling supramolecular biovectors: a new dimension in novel drug delivery systems" PHARMAZIE, vol. 52, no. 4, avril 1997, pages 259-267, XP002042298 -----	
2		

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

1. Demande internationale n°
PCT/FR 97/02332

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. Les revendications n°^{es} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210
2. Les revendications n°^{es} se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. Les revendications n°^{es} sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtent ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°^{es}
4. Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°^{es}

Remarque quant à la réserve

Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.

Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

Remarque : Bien que les revendications 24-26 (pour autant que cela concerne une méthode *in vivo*) concernent une méthode de traitement du corps humain/animal (règle 13.1(IV) PCT), la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit/à la composition.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Doc	Internationale No
PCT/FR 97/02332	

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9221329 A	10-12-92	FR 2677249 A AT 152619 T CA 2088759 A DE 69219561 D DE 69219561 T EP 0542969 A JP 6500570 T	11-12-92 15-05-97 05-12-92 12-06-97 13-11-97 26-05-93 20-01-94
WO 9221330 A	10-12-92	FR 2677272 A AT 145822 T CA 2088910 A DE 69215652 D EP 0547191 A JP 6500795 T	11-12-92 15-12-96 06-12-92 16-01-97 23-06-93 27-01-94
WO 9420078 A	15-09-94	FR 2702160 A AT 158179 T CA 2157384 A DE 69405718 D DE 69405718 T EP 0687173 A EP 0782851 A EP 0787479 A JP 8507765 T	09-09-94 15-10-97 15-09-94 23-10-97 19-03-98 20-12-95 09-07-97 06-08-97 20-08-96
EP 344940 A	29-11-89	FR 2631826 A ES 2054048 T WO 8911271 A JP 4500662 T US 5151264 A	01-12-89 01-08-94 30-11-89 06-02-92 29-09-92